

Nachweis von Arzneistoffen in kleinen Blutproben

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch – Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Manfred Posch
aus Berlin

1967

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Nachweis von Arzneistoffen in kleinen Blutproben

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch – Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Manfred Posch
aus Berlin

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. E. Vidic
Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. G. Schenck
Dritter Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 4. 11. 1966

Tag der Promotion:

1. JAN. 1967

1. JAN. 1967

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Professor Dr. ing. Ernst Vidic im Institut für gerichtliche und soziale Medizin der Freien Universität Berlin angefertigt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Vidic danke ich herzlich für die jederzeit gewährte, wohlwollende Hilfe und großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. W.Krauland, dem Direktor des Instituts für gerichtliche und soziale Medizin der Freien Universität Berlin, danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und für die Bereitstellung der Mittel.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für die zeitweise Gewährung einer finanziellen Unterstützung zu Dank verpflichtet.



Meiner lieben Mutter in Dankbarkeit
gewidmet.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1. Die Bedeutung des Nachweises von Arzneimitteln in den Blutproben von Verkehrsteilnehmern..... 1
2. Die Auswahl der in Frage kommenden Arzneistoffe..... 3
3. Der Stand der Arbeitsmethodik und der Nachweisverfahren..... 9

B. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EXTRAKTION VON ARZNEISTOFFEN AUS BLUTPROBEN SOWIE DIE REINIGUNG DER EXTRAKTE UND DER NACHWEIS DER SAUREN UND NEUTRALEN ARZNEISTOFFE

1. Auswahl der analytischen Verfahren zum Nachweis der Arzneistoffe nach verschiedenen Gesichtspunkten..... 15
2. Versuche zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung der sauren Substanzen..... 18
3. Versuche zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Neutralstoffe..... 30
4. Die Detektion der Wirkstoffe auf den Dünnschicht - Systemen..... 39
5. Die Extraktion der Arzneistoffe aus den Blutproben..... 52
6. Die Vorversuche zur Reinigung der Rohextrakte..... 59
 - I. Säulenchromatographische Versuche..... 59
- II. Anwendung der Dünnschichtchromatographie zur Reinigung biologischer Extrakte..... 69
- III. Verteilung zwischen zwei flüssigen Phasen.... 70
 7. Die Modifikation des Verfahrens von SUNSHINE und GERBER..... 72
 - I. Vor- und Nachteile des Verfahrens..... 72
 - II. Besprechung der eigenen Verbesserungen des Verfahrens..... 76

III. Allgemeine Betrachtungen zum Analysen- verfahren.....	85
8. Arbeitsvorschrift für das neue Verfahren zur Isolierung der sauren und neutralen Arzneistoffe aus Blutproben.....	87
C. SCHLÜSSE UND FOLGERUNGEN, DIE SICH AUS DEM ERGEBNIS DER CHEMISCHEN ANALYSE ERGEBEN.....	96
D. ZUSAMMENFASSUNG.....	98
E. LITERATURVERZEICHNIS.....	102

VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Tab. 1	Barbitursäurederivate.....	5
Tab. 2	Thiobarbitursäurederivate.....	6
Tab. 3	Hydantoinderivate.....	6
Tab. 4	Neutralstoffe.....	7
Abb. 1	Schema des Extraktionsverfahrens nach SUNSHINE und GERBER.....	12
Abb. 2	Schema des Extraktionsverfahrens nach CURRY und PHANG.....	13
Abb. 3	Schema des Extraktionsverfahrens nach STREET.....	14
Tab. 5	Dünnschichtchromatographische Trennungen von Barbitursäurederivaten nach der Lite- ratur.....	19
Tab. 6	Eigene dünn-schichtchromatographische Tren- nungen mit basischen Fließmitteln.....	21
Tab. 7	Barbitursäurederivate, unverändert bei H_2SO_4 - Einwirkung.....	24
Tab. 8	Barbitursäurederivate, die bei H_2SO_4 - Ein- wirkung "dealkyliert" werden.....	25
Tab. 9	Barbitursäurederivate, stark verändert bei H_2SO_4 - Einwirkung.....	26
Tab. 10	Dünnschichtchromatographie der Thiobarbi- tursäurederivate.....	27

Tab. 11	Dünnschichtchromatographie der Hydan- toinderivate.....	28
Tab. 11a	Unterscheidung verschiedener Arznei- stoffe.....	29
Tab. 12	Dünnschichtchromatographische Trennun- gen verschiedener Nichtbarbiturate.....	32
Tab. 13	Auftrennung von Neutralstoffen in ver- schiedenen Dünnschicht - Systemen.....	37
Abb. 4	Schematische Übersicht über die Auf- trennung der Neutralstoffe.....	38
Tab. 14	Verhalten verschiedener Neutralstoffe gegenüber Reagenzien.....	41
Tab. 15	Reaktionen der Neutralstoffe mit be- sonderen Reagenzien.....	48
Abb. 5	Adsorptionschromatographie an Florisil...	67
Abb. 6	Adsorptionschromatographie an Magne- siumsilikat.....	68
Tab. 16	Ausbeute an Arzneistoffen nach dem eige- nen Verfahren.....	84
Abb. 7	Gegenüberstellung der beiden Verfahren zur Demonstration von Verunreinigungen...	89
Abb. 8	Schema des neuen Reinigungs- und Tren- nungsganges.....	90

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1. Die Bedeutung des Nachweises von Arzneimitteln in den Blutproben von Verkehrsteilnehmern

Die zunehmende, oft gewohnheitsmäßige Einnahme von Medikamenten durch Führer von Kraftfahrzeugen spielt heute in der Verkehrsmedizin eine große Rolle. Bei gleichzeitigem Alkoholgenuß liegt häufig eine kombinierte Alkohol - Medikament - Wirkung vor. In manchen Fällen kann auch Arzneimittelwirkung allein eine alkoholische Beeinflussung vortäuschen.

H.J.WAGNER (17) stellte bei einer Überprüfung von 2060 alkoholisierten Personen, die sich im Jahre 1960 in Rheinland - Pfalz infolge eines Unfalls, einer auffällig-verkehrswidrigen Fahrweise oder nach einer Verkehrskontrolle einer Blutalkoholprobe unterziehen mußten, bei 11,1% der Probanden eine Arzneimittelaufnahme vor der Blutprobe fest. Dabei dominierten die Analgetica (50%), gefolgt von den Magen- und Darmmitteln (12%) und den Sedativa (9,6%). Derselbe Autor berichtet 1963 (18), daß von 10 000 Personen 10,3 - 14,5% zur Zeit der Blutentnahme unter Arzneimittelaufnahme gestanden haben. OSTERHAUS (19) teilt aus eigenen Untersuchungen mit, daß von 5 200 alkoholisierten Kraftfahrern 14,5% Arzneimittel eingenommen hatten. Nach PRIBILLA (20) war bei einer stichprobenartigen Gegenüberstellung von 3262 alkoholisierten Personen im Jahre 1957 und 6885 Untersuchten im Jahre 1962 ein Anstieg der Anzahl der Personen, die Medikamente eingenommen hatten, von 5,8% (1957) auf 9,3% (1962) zu verzeichnen. Dabei stehen die Analgetica (32,9%) neben den Hypnotica (2,8%) an der Spitze.

In der letzten Zeit mehren sich die Fälle, bei denen das Ergebnis einer Blutalkoholbestimmung nicht ausreicht, um eine nach den Tatumständen wahrscheinliche und auch ärztlich festgestellte Fahruntüchtigkeit eines Kraftfahrers zu

erklären. Der medizinische Sachverständige vor Gericht muß sich dabei mit den Einreden der Angeklagten auseinandersetzen, sie hätten unter dem Einfluß von Medikamenten, deren negative Wirkung auf die Fahrtüchtigkeit ihnen zuvor nicht bekannt gewesen sei, das Fehlverhalten im Verkehr gezeigt.

Es ergibt sich also die Frage, auf welche Weise der stattgehabte Medikamenteneinfluß bei dem Beschuldigten nachgewiesen werden kann. Insbesondere gilt es zu überprüfen, ob überhaupt eine Medikamenteneinnahme stattgefunden hat, ob die Arzneistoffe in den angegebenen Mengen eingenommen wurden und ob der Zeitpunkt ihrer Zufuhr richtig angegeben wurde.

Als Untersuchungsmaterial steht dabei gewöhnlich Harn zur Verfügung, sofern der Sistierte unmittelbar bei der Blutprobe auf eine Arzneimittelaufnahme hingewiesen hat. Es ist jedoch, wie VIDIC (21), G.SCHMIDT (22), SOEHRING (23) und OSTERHAUS (24) schon vor längerer Zeit ausgeführt haben, unzulässig aus dem Ergebnis der Harnanalyse auf eine Medikamentenwirkung zur Tatzeit Rückschlüsse zu ziehen. Zwar kann der Nachweis eines Arzneimittels im Harn wertvolle Aufschlüsse über die Zeit der Arzneimittelaufnahme geben - soweit die Fragen des Metabolismus im Körper und die Ausscheidung dieser Substanzen im Harn geklärt sind - es ist jedoch unmöglich, über die Arzneimittelkonzentration im Organismus zur Tatzeit etwas auszusagen. Überdies ist noch zu bedenken, daß sehr häufig die Schutzbehauptung einer Arzneimittelaufnahme erst bei der Gerichtsverhandlung vorgebracht wird und eine im Zeitpunkt der Untersuchung des Beklagten entnommene Harnprobe natürlich nicht mehr zur Verfügung steht oder daß - wie PRIBILLA (20) ausführt - zwar eine Blutprobe gemäß § 31a StPO zu erlangen ist, wegen des tätlichen Widerstands des Beschuldigten jedoch keine Harnprobe.

Aus den angeführten Tatsachen ergibt sich, daß es von grober Bedeutung ist, wenn auch in Blutproben ein qualitativer

ver und quantitativer Nachweis von Medikamenten geführt werden kann. Hierbei könnte so verfahren werden, daß der nach der Blutalkoholbestimmung in den Venülen verbliebene Rest des Blutes zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung verwendet wird.

Ein Medikamenten-Nachweis in den geringen Restblutproben von Verkehrsteilnehmern kann dem medizinischen Sachverständigen weitaus bessere Möglichkeiten zur Beurteilung der Verkehrstüchtigkeit und der strafrechtlichen Verantwortlichkeit gemäß § 51 Abs.1 oder 2 StGB bieten.

2. Die Auswahl der in Frage kommenden Arzneistoffe

Von der Vielzahl der Arzneistoffe, die die befragten Personen eingenommen haben wollen, kommen jedoch nur bestimmte Medikamentengruppen für eine chemische Untersuchung in Betracht. Es handelt sich dabei um jene Substanzen, die allein oder gleichzeitig mit Alkohol eingenommen, eine Beeinträchtigung der Verkehrstauglichkeit der Teilnehmer am öffentlichen Straßenverkehr bewirken können.

In einer Stellungnahme der Bundesärztekammer vom 10.1.1964 wird eine Aufstellung derjenigen Arzneimittel veröffentlicht, bei deren Verordnung ein Arzt dem Patienten empfehlen sollte, kein Kraftfahrzeug während der Therapie zu führen.

Folgende, pharmakologisch geordnete Gruppen werden dort genannt:

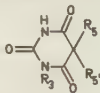
- I Narkosemittel
- II Schlaf- und Beruhigungsmittel
- III Psychopharmaka
- IV Antiepileptika
- V Antihistaminica, Mittel gegen Reisekrankheiten
- VI Stimulantien und Appetitzügler
- VII Hochdruckmittel
- VIII Spinale Muskelrelaxantia

Aus dieser Aufstellung der 8 Medikamentengruppen sollte nun auch nach chemischen Gesichtspunkten eine Auswahl getroffen werden. Es war nun die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, die Untersuchungen auf alle jene Arzneistoffe zu erstrecken, die bei der Extraktion mit organischen Lösungsmitteln aus saurer oder neutraler Lösung anfallen. Aus den in den Statistiken der verschiedenen Autoren (H.J.WAGNER (17), PRIBILLA (20)) sehr häufig erwähnten Gruppen der Schlaf- und Beruhigungsmittel (II) und aus der später von KREUSCHER und FREY (25) miteinbezogenen Gruppe der Analgetica, kommen somit die in den folgenden Tabellen (1 - 4) zusammengestellten Stoffe zur Untersuchung.

Tabelle 1

I Barbitursäurederivate

Allgemeine Formel der Barbitursäurederivate



Internationaler Name des Barbiturats	Handelsname	Substituenten in der Stellung		
		R ₂	R ₅	R _{5'}
Allobarbital	Dial	H	Allyl	Allyl
Aprobarbital	Allional ^x)	H	Allyl	1'-Methyläthyl
Amobarbital	Stadadorm	H	Äthyl	3'-Methylbutyl
Barbital	Veronal	H	Äthyl	Äthyl
Butabarbital	Neravan	H	Äthyl	1'-Methylpropyl
Butalbital	Optalidon ^x)	H	Allyl	2'-Methylpropyl
Brallobarbital	Vesparax ^x)	H	Allyl	2'-Bromallyl
Cyclobarbital	Phanodorm	H	Äthyl	1'-Cyclohexenyl
	Cyclopal	H	Allyl	1'-Cyclopentenyl
	Eldoral	H	Äthyl	1'-Piperidyl
Heptabarbital	Medomin	H	Äthyl	1'-Cycloheptenyl
	Melidorm	H	Äthyl	Grotyl
Pentobarbital	Repocal	H	Äthyl	1'-Methylbutyl
	Pernocton	H	2"-Bromallyl	1'-Methylpropyl
Phenobarbital	Luminal	H	Äthyl	Phenyl
Propallylonal	Noctal	H	2"-Bromallyl	1'-Methyläthyl
	Rectidon	H	2"-Bromallyl	1'-Methylbutyl
Secobarbital	Vesparax ^x)	H	Allyl	1'-Methylbutyl
	Tempidorm ^x)	H	Allyl	Pentyl
Vinylbital	Speda	H	Vinyl	1'-Methylbutyl
	Eunarcoo	Methyl	2"-Bromallyl	1'-Methyläthyl
Hexobarbital	Evipan	Methyl	Methyl	1'-Cyclohexenyl
Methylphenobarbital	Prominal	Methyl	Äthyl	Phenyl

^x) Diese Spezialitäten enthalten das Barbiturat neben anderen Substanzen

Tabelle 2

II Thiobarbitursäurederivate

Allgemeine Formel der Thiobarbiturate

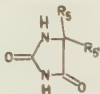


Internationaler Name des Thiobarbiturats	Handelsname	Substituenten in der Stellung	
		R ₅	R _{5'}
Thiopental	Baytinal	Äthyl	2'-Methyl propyl
	Inactin	Äthyl	1'-Methylpropyl
	Trapanal	Äthyl	1'-Methylbutyl
Methitural	Thiogenal	β-Methyl- thioäthyl	1'-Methylbutyl

Tabelle 3

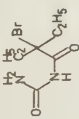
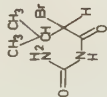
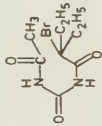
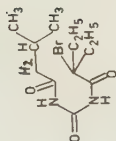
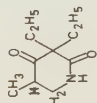
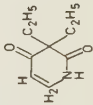
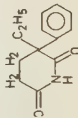
III Hydantoinderivate

Allgemeine Formel der Hydantoine



Internationaler Name der Hydantoine	Handelsname	Substituenten in der Stellung		
		R ₃	R ₅	R _{5'}
Aethotoin	Nirvanol	H	Äthyl	Phenyl
	Zentropil	H	Phenyl	Phenyl
Mephenytoin	Mesantoin	Methyl	Phenyl	Phenyl

Tabelle 4

Internationaler Name des Arzneistoffs	Chemische Bezeichnung	Handelsname	Chemische Formel
Carbromal	α -Bromdiäthylacetyl- carbamid	Adalin	
Bromisoval	α -Bromisovalerianyl- carbamid	Bromural	
	N-Acetyl-N'- α -brom- diäthylacetylcarba- mid	Abasin	
	N-Acetylisopropyl- N'- α -bromdiäthyl- carbamid	Nocturreten	
Methyprylon	3,3-Diäthyl-5-methyl- 2,4-diketopiperidin	Noludar	
Pyrrithyldion	3,3-Diäthyl-2,4-di- keto-tetrahydropi- peridin	Persedon	
Glutethimid	3-Phenyl-3-äthyl- 2,6-diketo-piperidin	Doriden	

Internationaler Name des Arzneistoffs	Chemische Bezeichnung	Handelsname	Chemische Formel
Ethinamat	1-Athinyl-cyclohexyl- carbamat	Valamin	
Methylpentynol	3-Methyl-1-pentin-3- ol	Allotropal	
Meprobamat	2-Methyl-2-n-propyl- 1,3-propanediol-di- carbamat	Miltam	
Methaqualon	2-Methyl-3-o-tolyl- 4(3H)-chinazolinon	Revonal	
Phenacetin	N-Acetyl-anilin	Azetanilid	
Phenazon	N-Acetyl-4-äthoxy- anilin	Phenazetin	
	1-Phenyl-2,3-dime- thyl-pyrazolon	Antipyrin	
Coffein	1,3,7-Trimethyl- xanthin	Coffein	

3. Der Stand der Arbeitsmethodik und der Nachweisverfahren

Die chemisch - analytischen Verfahren, die zum Nachweis von Arzneistoffen in Blutproben zur Anwendung gelangen, müssen bestimmten - von G.SCHMIDT (26) allgemein formulierten - Forderungen genügen. Sie sollen

1. eine hohe Informationskapazität besitzen und dadurch hochspezifisch sein
2. eine hohe Empfindlichkeit zeigen
3. einen geringen Arbeitsaufwand erfordern
4. eine geringe Störanfälligkeit aufweisen
5. eine Möglichkeit zur Dokumentation bieten.

Vor dem eigentlichen Nachweis eines bestimmten Arzneistoffes muß zunächst eine Abtrennung aus dem biologischen Material vorgenommen werden. Das von STAS (27) und OTTO (28) entwickelte Verfahren wird heute für zu langwierig und zeitraubend gehalten und überdies sind die gewonnenen Extrakte noch sehr stark verunreinigt (FREIMUTH (29)).

Diese Mängel des klassischen Verfahrens haben nunmehr viele Autoren durch entsprechende Modifikationen teilweise beseitigt. Man kann die neuen Methoden zur Extraktion saurer und neutraler Arzneistoffe in 4 Gruppen einteilen:

I. Bei vielen Schnellverfahren werden die Arzneistoffe direkt aus der manchmal verdünnten und oft abgepufferten Blutprobe durch Ausschüttelung mit einem organischen, mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel extrahiert.

GOULD und HINE (30) sowie BÄUMLER und RIPPSTEIN (31) schütteln die schwach angesäuerte Blutprobe mit Äther aus, BONNICHSEN et al. (32) sowie GOLDBAUM (33) empfehlen Chloroform, der letztere auch Dichloräthan. CURRY (34) zieht auch Chloroform zur Extraktion vor. McCALLUM (35) sowie SUNSHINE und GERBER (36) extrahieren zunächst die alkalisierte und danach wieder angesäuerte Blutprobe mit Chloroform.

Bei der Extraktion von einzelnen Neutralstoffen werden neben Chloroform (CURRY (34)) auch Äthylacetat (SHEPPARD et al. (37), ALGERI et al. (38)) vorgeschlagen.

In der letzten Zeit wird die von ALHA und LINDFORS (39) eingeführte Methode der Extraktion mit 70%igem Azeton empfohlen.

II. Bei älteren Blutproben oder geringen Konzentrationen von Arzneistoffen im Blut werden kontinuierliche Extraktionsverfahren zur Anwendung gebracht. Nach Verdünnen des Blutes werden die Proben kontinuierlich in verschiedenen konstruierten Flüssigkeitsperforatoren mit organischen Lösungsmittel extrahiert.

Bei der Methode nach FELDSTEIN und KLENDSHOJ (40) wird die verdünnte, angesäuerte Blutlösung bei 100°C mit Chloroform in einem besonders gebauten Flüssigkeitsperforator extrahiert.

UMBERGER et al. (41) haben ein Verfahren beschrieben, bei dem die angesäuerte Blutlösung durch 95%igen Äthylalkohol bei 60°C ausgezogen wird.

CURRY und PHANG (42) haben noch eine weitere Verbesserung der vorher genannten Methode erzielt, indem sie vorschlugen, eine Vakuumextraktion bei 30°C vorzunehmen und unter Verwendung eines eigens dafür hergestellten Apparates mit absolutem Alkohol zu extrahieren.

III. Es haben sich aber auch Verfahren bewährt, bei denen zunächst das Blut auf eine Trägersubstanz oder einen Trägerstoff gebracht wird und danach mit organischen Lösungsmitteln behandelt wird. Von KOPPANYI et al. (43) ist Calciumsulfat verwendet worden, RAVENTOS (42) benutzt Natriumphosphat, LEVY (45) gebraucht Ammoniumsulfat und VIDIC (46) empfiehlt Seesand und Natriumsulfat, sowie ein Gemisch von Kieselgur und Kieselgel.

IV. Zur Vermeidung von Emulsionen und zur Vermeidung pro-

teinhaltiger Extrakte wird von manchen Autoren (KOPPANYI (43), STREET (47)) zuerst eine Eiweißfällung nach FOLIN-WU (48) oder nach einem modifizierten Verfahren vorgenommen. Sodann wird meist direkt ausgeschüttelt.

Aus der Vielzahl der Verfahren sollen 3 charakteristische und später noch zu diskutierende Verfahren herausgegriffen werden.

Für die Gruppe I : Verfahren nach SUNSHINE und GERBER (36)

Für die Gruppe II : Verfahren nach CURRY und PHANG (42)

Für die Gruppe IV : Verfahren nach STREET (47)

Nach der Extraktion der Arzneistoffe ist es immer erforderlich, den erhaltenen Rohextrakt noch weiter zu reinigen. Die verschiedenen Möglichkeiten sind aus den Schemata zu ersehen. (Abb. 1, 2, 3)

Zur Identifizierung der Wirkstoffe werden verschiedene physikalische Verfahren wie Messung der Ultraviolettabsorption oder der Infrarotabsorption herangezogen.

Weitverbreitet sind chromatographische Verfahren wie Papierchromatographie, Dünnschicht- und Säulenchromatographie sowie die Gaschromatographie, auf deren Verwendbarkeit später noch eingegangen wird.

Abb. 1

Schema des Extraktionsverfahrens, der Abtrennung und Reinigung der sauren und neutralen Arzneistoffe nach SUNSHINE und GERBER

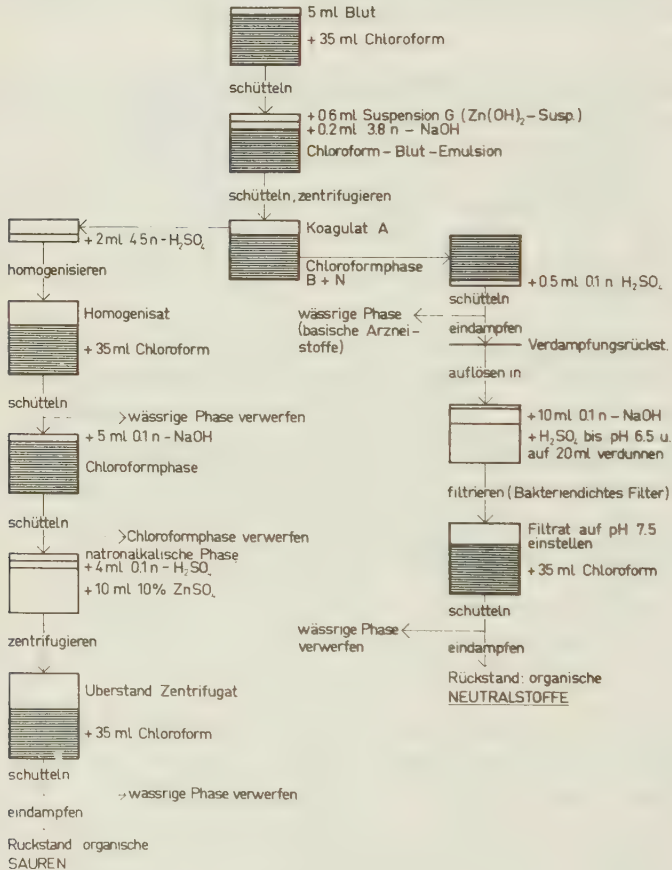
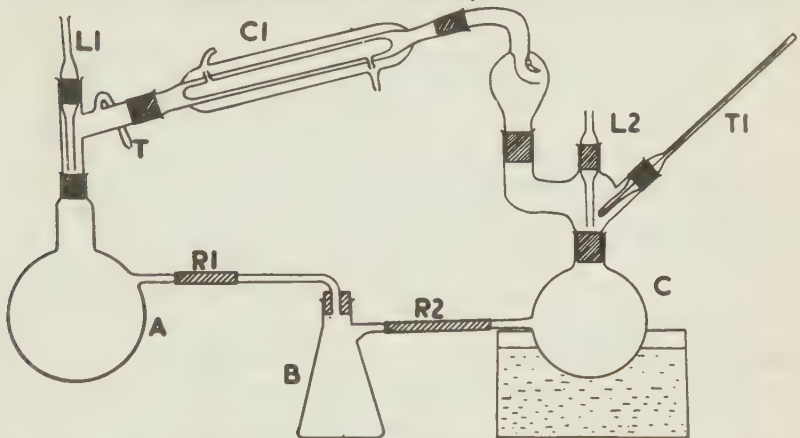


Abb. 2

Schema des Extraktionsverfahrens, der Abtrennung und Reinigung der sauren und neutralen Arzneistoffe aus dem Blut nach CURRY und PHANG.

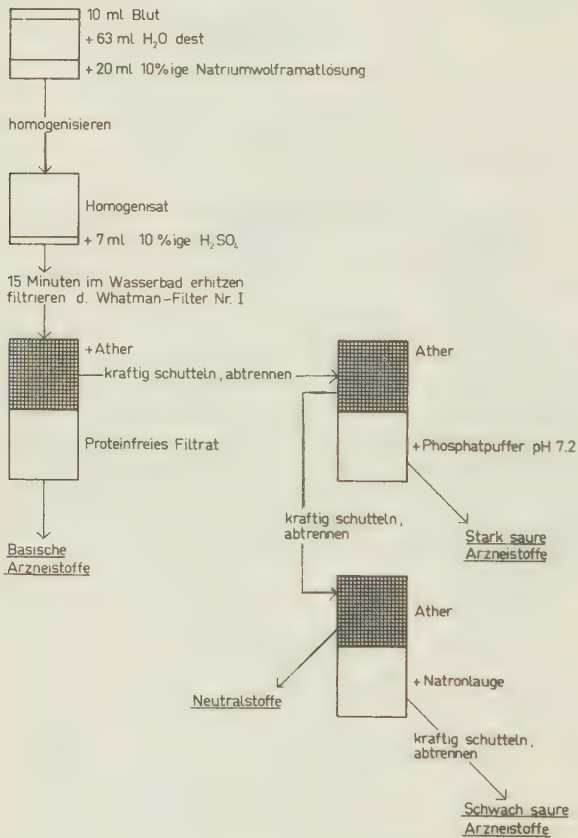


Prinzip der Apparatur: In den Rundkolben A (1 - 2 L Inhalt) werden das Blut und 95 %iger Äthylalkohol gegeben. Über ein seitliches Rohr gelangt der Alkoholextrakt in die konische Flasche B mit seitlichem Überlauf, die mit abs. Äthanol gefüllt ist und zur Abscheidung der Fette und Lipide dient. Über die Schlauchverbindung R 2 gelangt der Extrakt in den Destillationskolben C mit Thermometer T1 und Siedekapillare L 2. Der Alkohol wird nun abdestilliert, im Kühler CI kondensiert und läuft wieder in den Kolben A zurück. Bei T wird ein Wasserstrahlvakuum angelegt.

100 g Blut + 1 L 95 % Äthanol
 ↓ extrahieren bei 30° C und 10 mm Hg
 Äthanolextrakt
 ↓ kalt filtrieren
 Extrakt + 300 ml Wasser
 ↓ stehen lassen
 Präzipitat abfiltrieren
 im Vakuum eindampfen
 Rückstand
 (Filterrückstand prüfen auf wasserunlösliche Stoffe) ← in 100 ml Wasser aufnehmen, auf 50° C erwärmen, filtrieren
 Wässrige Lösung
 ↓ schwach ansäuern mit Äther oder Chloroform extrahieren
 (Wasserphase: Basen) ← Äther- oder Chloroformphase
 ↓ eindampfen
saure und neutrale Arzneistoffe

Abb. 3

Schema des Extraktionsverfahrens, der Abtrennung und Reini-
gung der sauren und neutralen Arzneistoffe nach H.V STREET



B. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EXTRAKTION VON ARZNEISTOFFEN AUS BLUTPROBEN SOWIE DIE REINIGUNG DER EXTRAKTE UND DER NACHWEIS DER SAUREN UND NEUTRALEN ARZNEISTOFFE

1. Die Auswahl der analytischen Verfahren zum Nachweis der Arzneistoffe nach verschiedenen Gesichtspunkten

Im Hinblick auf die geringen Substanzmengen, die in den nach der Blutalkoholbestimmung übrigbleibenden geringen Mengen der Blutproben enthalten sind, kann selbstverständlich nur ein mikroanalytisches Verfahren zum Ziele führen.

Es bieten sich dabei die chemisch - physikalischen Verfahren der Spektroskopie, als auch der Chromatographie an. Für einen spezifischen Nachweis ist natürlich ein Verfahren sehr günstig, das möglichst beide Methoden einbezieht. Bei der Durchführung der chemisch - toxikologischen Analysen sollte ja immer, wenn nur irgend möglich, darauf geachtet werden, daß zwei voneinander völlig unabhängige Verfahren die gleiche Aussage erbringen.

Es soll nun zunächst die Möglichkeit betrachtet werden, mit Hilfe der Ultraviolettabsorption von Arzneistoffen diese nachzuweisen und auch möglichst quantitativ zu bestimmen. Viele Verfahren arbeiten dabei mit einem recht geringen Arbeitsaufwand. Grundsätzlich soll aber bemerkt werden, daß alle verwendeten Lösungsmittel von höchster Reinheit und mit Säure- und Alkali gewaschen sein müssen. Auftretende Trübungen in den zu messenden Lösungen können durch Zugabe von Celite oder Kieselgur mit nachfolgendem Zentrifugieren beseitigt werden (FELDSTEIN (49)). Werden nur wenige Reinigungsoperationen vorgenommen, so muß damit gerechnet werden, daß im Wellenlängenbereich unter 250 m durch Verunreinigungen und Chromogene so starke Störungen auftreten, daß hier Messungen nicht möglich sind. Die von FELDSTEIN (49) angegebene Methode zur Extraktion von Arzneistoffen aus Blutproben erscheint jedoch nur bei hohen Gehalten an Arzneistoffen anwendbar zu

sein. Zur raschen Identifizierung jedoch ist sie bei Verwendung der von CURRY (50) angegebenen Tabellen der Extinktionsmaxima und der $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ - Werte sehr nützlich.

Die Barbiturate können in einem gereinigten Extrakt leicht im UV-Licht identifiziert und quantitativ bestimmt werden. Wird die Messung der UV-Absorption in alkalischer Lösung vorgenommen, so kann man anschließend nach Ansäuern der Probe die Barbiturate wieder ausschütteln und weiter nach einer anderen Methode bestimmen. Dieses Verfahren wurde in dem entwickelten Analysengang verwendet. Bei der Messung der Ultraviolettabsorption der aus neutraler Lösung extrahierbaren Arzneistoffe stößt man jedoch auf Schwierigkeiten. Viele Substanzen dieser Gruppe geben keine charakteristischen UV-Kurven (Methypylon, Carbromal, Bromisoval). Eine Messung ist nur in gepufferter, alkoholischer oder Chloroform-Lösung möglich, da manche Substanzen in stark alkalischer Lösung wie CURRY (51) und VIDIC (52) berichten, einer Zersetzung unterliegen und später nicht mehr unverändert aus der Prüflösung extrahiert, und damit nicht weiter nach einer anderen Methode untersucht werden können (Glutethimid, Carbromal). Dennoch lohnt sich eine spektrophotometrische Untersuchung, da einige wenige Substanzen dieser Gruppe sehr charakteristische Kurven ergeben. Die hohen molaren Extinktionskoeffizienten dieser Substanzen (Pyriethyldion, Phenacetin, Acetanilid) liefern sehr gute Hinweise, so daß diese Prüfung in den Untersuchungsgang aufgenommen wurde.

Bei der Untersuchung der Infrarotabsorption müssen die Anforderungen an die Reinheit einer Substanz viel größer sein als bei dem vorher erwähnten Meßverfahren. Auf jeden Fall muß man einen länger dauernden und recht aufwendigen Reinigungsprozeß durchführen, um Störungen auszuschalten. Das von SUNSHINE und GERBER (36) vorgeschlagene Reinigungsverfahren beseitigt zwar weitgehend Verunreinigungen durch fremde organische Stoffe, jedoch muß die Konzentration an Arzneimitteln in der Blutprobe recht hoch sein,

um ein verwertbares IR-Bandenspektrum zu erhalten. Nach den bisherigen Erfahrungen ist es erforderlich, mindestens eine Substanzmenge von 50 μg zu gewinnen, um bei Anwendung der Mikropresstechnik noch verwertbare Spektren schreiben zu können.

Die Anwendung dieser chemisch - physikalischen Methoden erfordert einen sehr großen Zeit- und Arbeitsaufwand und recht teure Apparaturen. Zur Vereinfachung des Verfahrens und zur möglichst weitgehenden Herabsetzung der Nachweisgrenze sollte daher versucht werden, in erster Linie dünn-schichtchromatographische Methoden anzuwenden, die im allgemeinen noch Bruchteile eines μg nachzuweisen gestatten. Die papierchromatographischen Verfahren erscheinen für den gedachten Zweck etwas weniger geeignet, da die Nachweisgrenze für die hier zu untersuchenden Substanzen durchschnittlich bei 5-10 μg liegt.

Bei der Dünnschichtchromatographie muß man allerdings in Kauf nehmen, daß Störungen durch Verunreinigungen viel stärker in Erscheinung treten. Die Hauptaufgabe bestand somit darin, ein geeignetes Verfahren zur Beseitigung aller störenden Begleitstoffe auszuarbeiten.

2. Versuche zur dünnenschichtchromatographischen Auftrennung saurer Substanzen

Die zahlreichen in der Literatur aufgeführten Verfahren zur Dünnschichtchromatographie der sauren Arzneistoffe (bisher wurden nur Barbiturate und Hydantoine untersucht) fußen im wesentlichen auf der von STAHL (8) angegebenen Standardmethode.

Dabei wird mit Hilfe eines Streichgeräts besonders gereinigtes Trägermaterial, oft mit Gipszusatz, in einer Schichtdicke von 0,25 mm auf 20 x 20 cm große Glasscheiben aufgebracht. Es wird meist aufsteigend in entsprechend großen Trögen, die ca. 100 ml Fließmittel enthalten und zur Kammersättigung mit Filtrierpapier ausgekleidet sind, chromatographiert.

Die Rf-Werte sind noch stärker als in der Papierchromatographie von so vielen Faktoren abhängig, daß sie, wie KELEMEN und PATAKI (53) ausführen, nur sehr schwer reproduzierbar sind und als Relativwerte angegeben werden sollten. Es ist deshalb günstiger, sie auf den Rf-Wert einer Standardsubstanz zu beziehen. Dabei ergibt sich der sogenannte Standardretentionswert R_{ST} . Die bei den später angeführten Chromatographien angegebenen Rf-Werte sind Relativwerte, die durch Vergleich mit den Rf-Werten gleichzeitig mit entwickelten Bezugssubstanzen korrigiert wurden. Für die Korrekturen wurden die Rf-Werte der nächstliegenden Substanzen eines Testgemisches verwendet.

MACHATA (55) hat 1960 die Anwendbarkeit der Dünnschichtchromatographie für die toxikologische Analyse zum ersten Mal beschrieben. Er beschrieb den Nachweis verschiedener Arzneistoffe, u.a. auch die Untersuchung saurer und neutraler Substanzen. Die Tabelle 5 zeigt einige ausgewählte dünnenschichtchromatographische Verfahren zur Auftrennung von Barbituraten. In dieser Übersicht ist die von PAULUS (54) erst kürzlich veröffentlichte Mitteilung noch nicht berücksichtigt worden, da keine Rf- oder andere Bezugswerte angegeben werden.

Tabelle 5

Dünnschichtchromatographische Trennungen einer Auswahl von Barbitursäurederivaten
zitiert nach Literaturangaben
(aufgeführt als 100 facher Rf-Wert)

Barbitursäurederivat I.N.N.	MACHATA (55) Kieselgel G Chloroform 85 Äther 15	BÄUMLER et al. (56) Kieselgel G Chloroform 90 Azeton 10	UHLIMANN (57) Kieselgel G Chloroform 90 Azeton 10	EBERHARDT et al. (58) Kieselgel G Kosinzusatz Petroliäther (Kp. 50-70°) 50 Piperidin 10	WALDI (59) Kieselgel G + Alum.oxid G Isopropanol 65 Cyclohexan 25 NH ₃ 25%	FRAHM et al. (korr.) (60) Kieselgel G Chloroform 45 Isopropanol 45 NH ₃ 25% 10
Phenobarbital	42	53 - 55	30	10	39	37
Barbital	48	48 - 50	28	25	43	49
Allobarbital	55	48 - 50	36		44	50
Cyclobarbital	48	54 - 56	35	20	45	52
Heptabarbital		54 - 56	37	20		55
Amobarbital		56 - 58	41		58	66
Pentobarbital		62 - 64	41		55	66
Secobarbital		69 - 71	44			67
Hexobarbital	(71)	84 - 86	50		(66)	76
Diff.: Hexob.-Phenob.	29	31	20		27	39

Zur Beurteilung der Trenneffekte wurde für jedes Chromatogramm die Differenz zwischen dem R_f - Wert von Hexobarbital (gewöhnlich höchster Wert) und von Phenobarbital (gewöhnlich tiefster Wert) gebildet. Diese Differenzen wurden für die Beurteilung der fremden und der eigenen Untersuchungen zu Grunde gelegt. Die in der Tabelle in Klammern gesetzten Werte wurden durch eigene Untersuchungen ergänzt.

In der tabellarischen Übersicht der Trennung von Barbitursäurederivaten kann man 2 wichtige Faktoren für die eigenen Untersuchungen erkennen:

1. Bei den in der Literatur zitierten Verfahren werden die größten Differenzen und damit zugleich die besten Auftrennungen dann erzielt, wenn den verwendeten Lösungsmittelgemischen eine Base zugesetzt wurde.
2. Schon bei der geringen Zahl der aufgeführten Barbiturate zeigt sich, daß "nicht trennbare Paare" auftreten. Darunter sollen diejenigen Barbiturate verstanden werden, die bei der Anwendung eines dünnschichtchromatographischen Systems nicht aufgetrennt werden können. Auch bei Anwendung von verschiedenen Systemen gelingt es meist nicht, diese Paare aufzutrennen.

Eigene Untersuchungen sollten deshalb einerseits klarstellen, ob durch systematische Variation von verschiedenen Lösungsmittelkombinationen eine bessere Trennung zu erreichen ist und ob eventuell mit einer anderen auch auf der Dünnschicht anwendbaren Methode eine Unterscheidung von Stoffen mit ähnlichen R_f - Werten herbeigeführt werden kann. Bei den nachfolgend beschriebenen Versuchen (Tabelle 6) werden nur diejenigen mit den besten Ergebnissen angeführt.

Tabelle 6

Tabelle der dünnsschichtchromatographisch getrennten
Barbiturate mit basischen Fließmitteln nach eigenen
Untersuchungen

Barbitursäurederivat I. N. N.	Benzol 50 Chloroform 75 Isopropanol 25 NH ₃ 25% 20 Kieselgel G	Benzol 50 Chloroform 50 Isopropanol 50 NH ₃ 25% 15 Kieselgel G	Benzol 75 Isopropanol 25 NH ₃ 25% 10 Kieselgel G	Chloroform 75 Isopropanol 25 NH ₃ 25% 20 Kieselgel G
Allobarbitral	12	41	20	24
Barbital	12	38	19	25
Phenobarbital	6	28	13	19
Cyclobarbitral	16	45	35	31
Propallylonal	16	44	34	29
Amobarbital	22	59	29	50
Hexobarbital	41	69	48	65
Differenz: Hexob.- Phenobarb.	35	41	35	46

Die in der Tabelle aufgeführten Werte für die R_f - Differenzen zeigen, daß die beste Trennung mit dem Fließmittelsystem Chloroform 75 Vol.T., Isopropanol 25 Vol.T., NH_3 25% 10 Vol.T. möglich ist.

Bei einer Überprüfung der R_f - Werte in diesem System zeigte es sich jedoch deutlich, daß einige Paare nicht voneinander zu trennen waren. So ergaben z.B. die Verbindungen

Allobarbital - Barbital
Amobarbital - Secobarbital
Aprobarbital - Butobarbital

je gleiche R_f - Werte.

Da durch Anwendung verschiedenartigster Dünnschichtsysteme (Anwendung von Zellulose, Aluminiumoxid, Magnesiumoxid und Polyamid mit alkalischen und sauren Imprägnierungen als Trägermaterial sowie verschiedener Fließmittel-Systeme mit Säuren und Basenzusatz) keine Trennung erreicht werden konnte, wurde eine andere Methode eingesetzt. MAYNERT und DAWSON (61) haben 1953 zum ersten Mal die Zersetzung verschiedener Barbitursäurederivate durch konzentrierte Schwefelsäure beschrieben. Eine nähere Untersuchung dieser Substanzen, die bei der Behandlung mit Schwefelsäure entstehen, unternahmen STREET und McMARTIN (62), die, fußend auf ihren eigenen Untersuchungen, später ein Verfahren zur Unterscheidung verschiedener Barbiturate entwickelten, die aus Blutproben extrahiert worden waren.

Eine amerikanische Forschergruppe PETZOLD et al. (63) versuchte die Barbiturate auf der Dünnschicht direkt mit 4n-Schwefelsäure zu behandeln. Nach der Einwirkung der Schwefelsäure konnten beim Vergleich der unbehandelten mit den behandelten Produkten Differenzierungen zwischen Secobarbital, Pentobarbital, Amobarbital, Phenobarbital und Allobarbital getroffen werden.

Bei den eigenen Arbeiten wurde versucht, diese Ergebnisse auf das selbst entwickelte Fließmittelsystem zu übertragen

und die Konzentration der Schwefelsäure weiter herabzusetzen. Das von den oben genannten Autoren entwickelte Laufmittel erwies sich für die eigenen Untersuchungen nicht brauchbar, da es zu stark elutrop war, so daß die N-methylierten Barbiturate bei der Entwicklung bis an die Lösungsmittelfront wanderten.

Bei Herabsetzung der Schwefelsäurekonzentration bis auf 1n konnte noch sicher ein Abbau erreicht werden. Nach dieser Arbeitsvorschrift werden die auf die Dünnschicht aufgetragenen Barbiturate mit 5-10 µl 1n-Schwefelsäure behandelt und die dünnschichtchromatographische Platte 45 Minuten lang auf 110° C erhitzt. Die untersuchten Barbiturate ließen sich dabei nach dieser Arbeitsvorschrift in 3 Gruppen einteilen:

1. Barbiturate, die bei der Behandlung mit H_2SO_4 stark verändert werden und auf dem Startpunkt zurückbleiben.
2. Barbiturate, die dabei einer teilweisen "Dealkylierung" unterliegen und deren Abbauprodukte charakteristische R_f - Werte zeigen.
3. Barbiturate, die bei der Schwefelsäureeinwirkung unverändert bleiben.

In die Untersuchungen wurden auch die Hydantoine und die Thiobarbiturate mit einbezogen.

Bei der Verwendung von zwei Dünnschichtsystemen (das eigene sowie das von BÄUMLER und RIPPSTEIN (31) vorgeschlagene) und der Behandlung mit Schwefelsäure lassen sich die meisten der toxikologisch interessanten, stark sauren Verbindungen unterscheiden.

Als Test- und Leitsubstanzen empfiehlt es sich auf jeder Platte Phenobarbital, Cyclobarbital und Hexobarbital mit aufzutragen.

Lsgm-Syst.I: Chlorof.-Isopropanol-Azeton- NH_3 25% 75:25:5:10

Lsgm-Syst.II: Chloroform - Azeton 9 : 1

Tabelle 7

Barbitursäurederivate, die bei der Einwirkung von $1n\text{-H}_2\text{SO}_4$ nicht verändert werden

Internationale Namen der Barbiturate	Handelsnamen der Barbiturate	Substitution in der Stellung der Barbiturate			100 facher Rf- Wert		KMnO ₄
		3	5	5	I	II	
Barbital	Veronal	H	Äthyl	Äthyl	25	28	-
Butobarbital	Soneryl	H	Äthyl	Butyl	38	39	-
Butabarbital	Neravan	H	Äthyl	1'-Methylpropyl	45	34	-
Pentobarbital	Reposal	H	Äthyl	1'-Methylbutyl	52	41	-
Amobarbital	Stadadorm	H	Äthyl	3'-Methylbutyl	50	41	-
Phenobarbital	Luminal	H	Äthyl	Phenyl	19	30	-
	Eldoral	H	Äthyl	Piperidyl	22	28	gelb
	Tempidorm*	H	Allyl	Pentyl	51	49	gelb
Vinylbital	Speda	H	Vinyl	1'-Methylbutyl	29	38	gelb
	Eunarcoon	Methyl	1'-Methyl- äthyl	2'-Bromallyl	75	64	gelb
Methylphenobarbital	Prominal	Methyl	Äthyl	Phenyl	47	53	-

* Das Barbiturat ist in diesen Spezialitäten neben anderen Substanzen enthalten

Tabelle 8

Barbitursäurederivate, die bei der Einwirkung von $12\text{-H}_2\text{SO}_4$ "dealkyliert" werden

Internationaler Name des Barbiturats	Handelsnamen der Barbiturate	Substitution in der Stellung des Barbiturats			100 facher Rf-Wert nach H_2SO_4 - Behandlung		KMnO_4
		3	5	5	I	II	
Propallylonal	Noctal	H	1'-Methyl- äthyl	2"-Brom- allyl	29	34	gelb
	Pernocton	H	1'-Methyl- propyl	2"-Brom- allyl	37	42	gelb
	Rectidon	H	1'-Methyl- butyl	2"-Brom- allyl	44	44	gelb

Tabelle 9

Barbitursäurederivate, die bei der Einwirkung von 1n-H₂SO₄ stark verändert werden

Internationale Namen; der Barbiturate	Handelsnamen der Barbiturate	Substitution in der Stellung des Barbiturats					100 facher Rf- wert	KMnO ₄
		3	5	5	5	5	I	II
Allobarbitol	Dial	H	Allyl	Allyl	Allyl	Allyl	24	36
Brallobarbitol	Vesparax*	H	Allyl	2'-Bromallyl			21	33
Aprobarbitol	Allional	H	Allyl	1'-Methyläthyl			38	38
Butalbitol	Optalidon*	H	Allyl	2'-Methylpropyl			43	41
Secobarbitol	Vesparax*	H	Allyl	1'-Methylbutyl			50	44
Cyclobarbitol	Cyclopal	H	Allyl	1'-Cyclopentenyl			37	35
Heptabarbitol	Phanodorm	H	Äthyl	1'-Cyclohexenyl			31	35
	Medomin	H	Äthyl	1'-Cycloheptenyl			39	37
	Melidorm*	H	Äthyl	Crotyl			47	41
Hexobarbitol	Evipan	Methyl	Methyl	1'-Cyclohexenyl			65	50

* Das Barbiturat ist in diesen Spezialitäten neben anderen Substanzen enthalten.

Tabelle 10

T h i o b a r b i t u r a t e

(Unverändert bei Einwirkung von $1n\text{-H}_2\text{SO}_4$)

Internationale Namen der Barbiturate	Handelsnamen der Barbiturate	Substitution in der Stellung des Barbiturats			100 facher Rf-Wert		KMnO ₄
		3	5	5	I	II	
Thiopental	Baytinal	H	Allyl	2'-Methyl- propyl	70	63	gelb
	Inactin	H	Äthyl	1'-Methyl- propyl	69	70	gelb
	Trapanal	H	Äthyl	1'-Methyl- butyl	76	73	gelb
Methitural	Thiogenal	H	β-Methyl- butyl	1'-Methyl- butyl	50	66	gelb

Tabelle 11

Hydantoinderivate

(Werden nicht durch 1 n-H₂SO₄ verändert und reagieren nicht mit KMnO₄)

Internationaler Name des Hydantoin	Handelsname	Chemische Bezeichnung	100 facher Rf - Wert I	II
Aethotoin	Nirvanol	Phenyläthylhydantoin	65	23
	Zentropil	Diphenylhydantoin	91	64
Mephenytoin	Mesantoin	Methyldiphenylhydantoin	58	29

System I : Kieselgel G, Chlorof.-Isopropanol-Aceton-NH₃ 75:25:5:10

System II: Kieselgel G, Chloroform - Aceton 9 : 1

Detektion Hg-I-nitrat

Bei einer Betrachtung der in den Tabellen 7 - 11 angeführten Rf - Werte, Färbungen mit KMnO_4 und Veränderungen mit $1\text{n-H}_2\text{SO}_4$ der sauren Substanzen kann man einsehen, daß die Unterscheidung der meisten Substanzen möglich ist. Es konnten natürlich nicht alle im Handel befindlichen sauren Arzneistoffe in die Untersuchung mit einbezogen werden. Beim Auftreten nicht genannter Stoffe muß dann eine Einordnung in das vorgeschlagene System vorgenommen werden. Aus mehreren Beispielen geht hervor, daß die Unterscheidung der verschiedenen Substanzen recht leicht gelingt.

Tabelle 11a

Arzneistoff	100facher Rf - Wert		KMnO_4	H_2SO_4
	I	II		
Allobarbital	24	36	gelb	stark verändert.
Barbital	25	28	-	unveränd.
Amobarbital	50	41	-	unveränd.
Secobarbital	50	44	gelb	stark verändert.
Aprobarbital	38	38	gelb	stark verändert.
Butobarbital	38	39	-	unveränd.
Pernocton	37	42	gelb	Rf in I 27
Cyclopal	37	35	gelb	stark verändert.
Cyclobarbital	31	35	gelb	stark verändert.
Propallylonal	29	34	gelb	Rf in I 21
Methitural	66	50	gelb	unveränd.
Aethotoin	65	23	-	unveränd.
Hexobarbital	66	50	-	stark verändert.

3. Versuche zur dünnsschichtchromatographischen Auftrennung der Neutralstoffe

Die dünnsschichtchromatographische Trennung neutraler Substanzen wurde bisher meist mit den gleichen Fließmitteln ausgeführt, wie sie für die sauren Substanzen vorgeschlagen worden sind.

So untersuchte MACHATA (55) einige Neutralstoffe, und auch BÄUMLER und RIPPSTEIN (56) beziehen neutrale Substanzen in ihre Untersuchungen mit ein. LINDFORS und RUOHONEN (64) behandelten die Identifizierung von Carbbromal und Bromisoval sowie ihrer Entbromungsprodukte. FRAHM et al. (60) beschreiben die Trennung mehrerer Barbiturate und Nichtbarbiturate und STAHL (8) gibt eine Trennung dreier Bromharnstoffverbindungen an, die sich jedoch bezüglich Carbbromal und Acetylcarbbromal in eigenen Versuchen nicht verifizieren ließ. In einer neueren Veröffentlichung gibt PAULUS (54) zwei Dünnschichtchromatographie-Systeme an, die eine Trennung von verschiedenen Nichtbarbituraten erzielen sollen, jedoch ohne Angabe von R_f - Werten.

Da nach den bisher bekannt gewordenen Verfahren eine sichere Auftrennung der verschiedenen neutralen Substanzen in einem einzigen System nicht durchführbar ist, sollte durch eigene Untersuchungen versucht werden, eine möglichst optimale und sichere Trennung zu erreichen.

Vorversuche zeigten, daß neutrale Substanzen an Kieselgelschichten mit Fließmitteln, die in der Hauptsache aus apolaren Lösungsmitteln und Zusatz von geringen Mengen eines polaren Fließmittels bestanden, gut zu trennen waren. Der Zusatz einer Base verbesserte den Trenneffekt noch weiter. Bei der Auswahl der dünnsschichtchromatographischen Systeme wurde weiterhin darauf geachtet, daß einerseits das in dieser Gruppe ausschüttelbare Methaqualon nicht bis an die Lösungsmittelfront wandert und andererseits, daß das an Kieselgel sehr stark adsorbierte Meprobamat nicht auf dem Startpunkt zurückbleibt, da es so

dem Nachweis entgehen könnte, wenn dort gleichzeitig Verunreinigungen verbleiben.

Außerdem wurde versucht, bei der Trennung Verunreinigungen, die sich bei der Extraktion von arzneimittelfreien Bluten zeigten, möglichst an die Lösungsmittelfront zu bringen.

Eine Auswahl der Dünnschichtchromatographie - Systeme, die den besten Erfolg bei diesen Untersuchungen zeigten, soll dies demonstrieren. Die Trennungen wurden ausschließlich auf Kieselgel G-Schichten ausgeführt.

Tabelle 12

Dünnschichtchromatographische Trennung verschiedener Nichtbarbiturate auf Kieselgel G - Schichten

Erklärung der Abkürzungen der untersuchten Arzneistoffe:

Carb.	=	Carbromal
Bromis.	=	Bromisoval
Mepr.	=	Meprobamat
Ethin.	=	Ethinamat
Glut.	=	Glutethimid
Pyrith.	=	Pyrithyldion
Methaqu.	=	Methaqualon

Die angegebenen Zahlenwerte sind die 100fachen R_f - Werte.
Bei zweiphasigen Fließmitteln wurde nur die organische Phase als Fließmittel verwendet.

Die Lösungsmittelmengen sind in Volumenteilen angegeben.

a) Fließmittel mit Basenzusatz

1. Toluol 75, Isopropanol 20, NH_3 25%ig 10.
Carb. 56, Bromis. 48, Mepr. 27, Ethin. 50, Glut. 64, Pyrith. 49.
2. Toluol 75, Isopropanol 20, NH_3 25%ig 10.
(Die Dünnschichtplatte wurde vor dem Eintauchen in das Fließmittel 1/2 Stunde in einer Ammoniak - Atmosphäre klimatisiert.)
Carb. 60, Bromis. 52, Mepr. 30, Ethin. 53, Glut. 63, Pyrith. 60.
3. Toluol 70, Chloroform 30, NH_3 25%ig 10.
Carb. 15, Bromis., Pyrith. dicht über dem Startpunkt, Ethin. 9, Glut. 13, Mepr. am Startpunkt.
4. Chloroform 90, Butanol 10, NH_3 25%ig 10.
Carb. 90, Bromis. 75, Ethin. 79, Glut. 93, Pyrith. 80.

5. Chloroform 95, Butanol 5, NH_3 25%ig 10.
Carb. 87, Bromis. 70, Ethin. 75, Glut. 91, Pyrith. 74.
6. Chloroform 100, NH_3 25%ig 10.
Carb. 60, Bromis. 25, Ethin. 41, Glut. 65, Pyrith. 32, Mepr. 4.
7. Chloroform 100, Azeton 5, NH_3 25%ig 10.
Carb. 66, Bromis. 31, Ethin. 41, Pyrith. 39, Glut. 76, Mepr. 6.
8. Dichloräthan 100, Äthanol 20, NH_3 25%ig 20.
Carb. 68, Bromis. 48, Ethin. 45, Pyrith. 50, Mepr. 14, Methaqu. 84.
9. Chloroform 60, Cyclohexan 20, NH_3 25%ig 20.
Carb. 33, Bromis 11, Ethin. 22, Pyrith. 35, Methaqu. 76.
10. Chloroform 60, Cyclohexan 20, Äthanol 5, NH_3 25%ig 20.
Carb. 60, Bromis. 34, Ethin. 48, Pyrith. 35, Methaqu. 86.
11. Chloroform 60, Cyclohexan 20, Butanol 5, NH_3 25%ig 20.
Carb. 53, Bromis. 26, Pyrith. 34, Ethin. 40, Methaqu. 92.
12. Chloroform 70, Cyclohexan 20, Pyridin 5.
(Fließmittelsystem nach STAHL (8))
Carb. 69, Bromis. 33, Ethin. 67, Pyrith. 33, Methaqu. 92.

b) Fließmittel mit Säurezusatz

1. Chloroform 100, Cyclohexan 30, Äthanol 5, Essigsäure 80%ig 10.
Carb. 78, Bromis. 71, Ethin. 71, Pyrith. 62, Methaqu. an der Front.
2. Chloroform 80, Tetrachlormethan 30, Ameisensäure 5.
Carb. 50, Bromis. 36, Ethin. 30, Pyrith. 19, Methaqu. 73.
3. Dichlormethan 80, Tetrachlormethan 20, Ameisensäure 4.
Carb. 69, Bromis. 51, Pyrith. 39, Methaqu. 7.
4. Dichlormethan 60, Tetrachlormethan 40, Ameisensäure 4.
Carb. 37, Bromis 25, Ethin. 31, Pyrith. 15, Mepr., Methaqu. auf dem Startpunkt.
5. Dichlormethan 60, Tetrachlormethan 40, Azeton 10, Ameisensäure 4. Carb. 42, Bromis. 29, Ethin. 36, Pyrith. 23, Mepr. 13, Methaqu. 17.

Bei einer kritischen Betrachtung der Fließmittelsysteme mit Basenzusatz erwies es sich, daß das System 7 die besten Trennmöglichkeiten bot. Eine Abtrennung der aus Blutproben stammenden Verunreinigungen konnte, wie später noch erläutert wird, jedoch nicht erreicht werden. Eine Zusammenstellung der R_f - Werte in diesem System (Tabelle 12) zeigt aber auch, daß gewisse Substanzpaare (Ethinamat - Glutethimid, Carbromal - Acetylcarbromal) nicht voneinander zu trennen waren. Es war deshalb naheliegend, ein zweites System zu entwickeln, das sich von dem vorgenannten sehr stark unterscheiden sollte. Für die Entwicklung eines solchen Systems waren folgende Überlegungen maßgebend:

Die Steighöhe einer Substanz innerhalb einer chromatographischen Trennung (Kammersättigung, Temperatur, Abstand Startpunkt - unterer Rand konstant) ist einerseits direkt proportional ihrer Löslichkeit in dem verwendeten Fließmittelgemisch und andererseits direkt proportional der Aktivität der stationären Phase z.B. durch Verwendung von Kieselgel konstant, wie es in eigenen Versuchen geschehen ist, so hat nur noch die Variation der Fließmittel Einfluß auf die Trennung. Ein Zusatz eines polaren Lösungsmittels bewirkt beispielsweise einen Anstieg der R_f - Werte.

Der Zusatz einer Base oder einer Säure kann jedoch eine starke Veränderung der Löslichkeit der betrachteten Substanz herbeiführen. Allgemein gilt, daß der Zusatz einer Base zum Fließmittel den Anteil der Salzkonzentration bei einer Substanz mit kleinem pK_s - Wert stark erhöht. Da dann der größte Teil der sauren organischen Substanz als Salz vorliegt, ist es verständlich, daß sie sich in einem hydrophilen Lösungsmittel besser löst oder daß der R_f - Wert, verglichen mit dem Fließmittelsystem ohne Basenzusatz, absinken muß.

Beim Zusatz einer Säure wird der undissoziierte Anteil der sauren Substanz im Sinne einer Pufferung stark er-

höht. Daraus resultiert eine Abnahme der Polarität und eine bessere Löslichkeit in lipophilen Lösungsmitteln.

Viele sogenannte "Neutralstoffe" sind, wenn auch gering, dennoch schwach sauer. Deshalb kann man ohne weiteres die Überlegungen für die sauren Substanzen bezüglich einer Trennung hierauf anwenden. Andere "Neutralstoffe" sind außerordentlich schwache Basen.

Eine Auftrennung der "neutralen" Substanzen einerseits durch ein Fließmittelsystem mit Basenzusatz und andererseits mit Säurezusatz erschien deshalb aussichtsreich, weil hierbei die unterschiedlichen Löslichkeitsverhältnisse der Substanzen ausgenutzt werden und die Adsorption an die Trägerschicht sehr stark variiert.

Diese Betrachtungen führten schließlich zu der Entwicklung eines Fließmittelgemischs, von dem vorausgesagt werden konnte, daß es aus relativ apolaren Lösungsmitteln und einer starken organischen Säure (wegen der besseren Mischbarkeit mit den organischen Lösungsmitteln) bestehen müßte.

Die Auswahl der Fließmittelgemische zeigt, daß eine Trennung in der vorausgesagten Weise möglich ist. Das System 5 eignet sich dabei besonders gut.

Es muß aber hervorgehoben werden, daß auch in diesem System Substanzpaare existieren, die nicht auftrennbar sind. Eine Anwendung beider vorgeschlagener Systeme führt in den meisten Fällen zum Erfolg. Sollten sich dennoch Schwierigkeiten ergeben und steht die zu untersuchende Substanz in ausreichender Menge zur Verfügung, kann noch eine Trennung in dem System Kieselgel G, Chloroform 90, Azeton 10, versucht werden. Eine vorhergehende UV - Spektroskopie der Chloroformlösung kann etwaige Zweifel von vornherein beheben.

Neben dem im nächsten Kapitel vorgeschlagenen allgemeinen Reagens werden noch weitere spezielle Reagentien für die

einzelnen Substanzen angegeben. In einem Fall wird auch eine Schwefelsäurebehandlung vorgeschlagen.

Aus der nachfolgenden Aufstellung, Tabelle 13, kann man ohne weiteres erkennen, wie Substanzen getrennt werden können, die in einem System gleiche R_f - Werte zeigen.

Die Trennung von Carbromal, Acetylcarbromal und der Wirkstoffe der Nocturetten ist nicht gelungen. Toxikologisch ist dies ohne besondere Bedeutung, da diese Substanzen ähnliche pharmakologische Wirkqualitäten zeigen.

Tabelle 13

Trennung der neutralen Arzneistoffe

Arzneistoff	Rf - Wert im Dünnschichtsystem			Reagenzien
	I	II	III	
Carbromal	42	68	51	} Bromnachweis nach BÄUMLER oder FEIGL
Acetylcarbromal	42	68	51	
Nocturetten	42	68	51	
Bromisoval	29	26	32	
Methyprylon	32	49	25	Nachw. n. DRESSLER
Pyrrithyldion	23	43	34	UV-Max. 296 nm/Chl.
Ethinamat	36	49	48	Hg ₂ (NO ₃) ₂ - Reaktion
Glutethimid	37	72	75	
Meprobumat	13	7	6	Reaktion mit Ehrlichs - Reagens
Methylparafynol	14	7	0	Hg ₂ (NO ₃) ₂ - Reaktion
Methaqualon	17	88	71	Dragendorff - Reag.
Acetylsalicyl- säure	59	0	0	FeCl ₃ - konz. HCL-R.
Phenacetin	19	53	35	
Acetanilid	32	56	42	H ₂ SO ₄ - Behandlung
Coffein	15	72	20	Purin - Reag.
Phenazon	9	55	24	Dragendorff - Reag.

System I : Kieselgel, Dichlormethan 60, Tetrachlormethan 40, Azeton 10, Ameisensäure 4.

System II : Kieselgel, Chloroform 100, Azeton 5, NH₃ 25% 10.

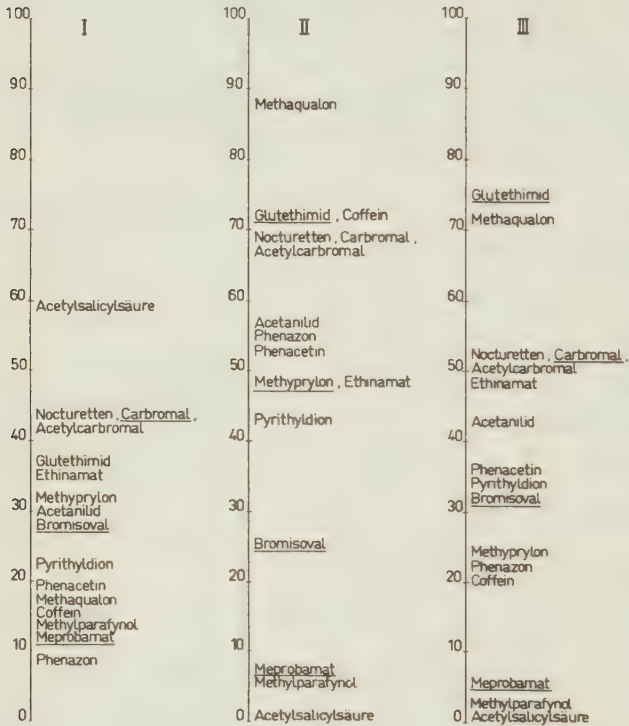
System III : Kieselgel, Chloroform 90, Azeton 10.

Bezüglich der Reagentien wird auf das nachfolgende Kapitel verwiesen. Die angegebenen Rf - Werte sind Mittelwerte aus 5 Bestimmungen.

Abb. 4

Schematische Übersicht über die Auftrennung von Neutralstoffen in den drei dünn-schichtchromatografischen Systemen

Die Zahlen bedeuten hundertfache Rf - Werte
 Unterstrichene Substanzen sind Leitsubstanzen



SYSTEM I = Kieselgel G - Dichlormethan 60 , Tetrachlormethan 40 , Azeton 10 , Ameisensäure 4 .

SYSTEM II = Kieselgel G - Chloroform 100 , Azeton 5 , NH₃ 25 % ig 10 (Lösungsmittelphase verwenden) .

SYSTEM III = Kieselgel G - Chloroform 90 , Azeton 10 .

4. Die Detektion der Wirkstoffe auf den Dünnschichtchromatographie - Systemen

Die Detektion der aufgetrennten Substanzen auf der Dünnschicht bietet wegen der sehr unterschiedlichen Reaktionen der sauren und neutralen Substanzen besondere Schwierigkeiten. Es sind bis jetzt noch keine Reagenzien mit ausreichend guter Spezifität und Empfindlichkeit bekannt, die alle Arzneistoffe dieser Gruppe anzeigen. Das liegt einerseits an der Verschiedenartigkeit der nachzuweisenden Substanzen und andererseits an der Ähnlichkeit mit körpereigenen Substanzen, die sich in den Extrakten aus biologischen Flüssigkeiten und Geweben als Verunreinigungen befinden.

Eine Minderung dieser Schwierigkeiten wird jedoch dadurch erreicht, daß durch den, dem Reinigungsverfahren angeschlossenen Trennungsgang die Substanzen in saure und neutrale Stoffe getrennt werden und jede Gruppe für sich nachgewiesen wird. Im folgenden sollen nun zunächst Reagenzien für die saure und dann für die neutrale Gruppe beschrieben werden. Sehr häufig werden gleiche Reagenzien in beiden Gruppen angewandt. Wenn diesen Reagenzien, trotz ihrer Unspezifität eine große Bedeutung zukommt, so liegt das daran, daß die Arzneistoffe durch ihre Gruppenzugehörigkeit und durch ihre R_f - Werte in den verschiedenen Dünnschichtchromatographie - Systemen genügend gut definiert sind und nur noch durch ein möglichst empfindliches und auf Verunreinigungen der Extrakte möglichst wenig ansprechendes Reagens nachgewiesen werden sollen.

Der Nachweis der sauren Substanzen durch die Reaktionen nach PARRI (65), modifiziert von ZWIKKER (66) und von KOPPANYI (67) eignet sich schlecht als Nachweismethode auf der Dünnschicht. Die Nachweisgrenze ist relativ hoch (50 μg) und die Reaktion ist recht unspezifisch, weil Hydantoine, Pyrimidine, Piperidinabkömmlinge, Sulfonamide und Purinderivate angezeigt werden.

Auch die Reaktion mit Quecksilber-I-nitrat ist als unspezifisch anzusehen (gesättigte Lösung von $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ in Wasser, ca. 0,5%). Es werden hierbei die Barbiturate, Hydantoine, Glutethimid, Ethinamat, Alkinole und auch Abbauprodukte von Methypylon, Pyrihyldion und Pyrazolonen nachgewiesen. Wegen der sehr guten Empfindlichkeit (Barbiturate und Hydantoine 10 μg , Glutethimid und Ethinamat 5 μg , N-methylierte Barbiturate 50 μg) und der Unempfindlichkeit gegen Verunreinigungen wird dieses Reagens sehr empfohlen. Um die Nachweisgrenze der N-methylierten Barbiturate zu erniedrigen, wird von SUNSHINE et al. (68) vorgeschlagen, eine Diphenylcarbazonlösung (5 mg in 50 ml Chloroform, nach eigenen Untersuchungen besser in Äthanol, wegen der geringeren Verdampfungsgeschwindigkeit beim Aufsprühen) nachzusprühen. Auch die Farbtiefe der anderen Flecken wird auf diese Weise verstärkt. Es gelingt dadurch, die N-methylierten Barbiturate in einer Menge von 10 μg nachzuweisen. Zur weiteren Differenzierung der anderen Barbitursäurederivate wird ein drittes Reagens, eine 0,1 n - KMnO_4 - Lösung auf die Dünnschichtplatte gebracht. In Tabelle 14 werden diese Möglichkeiten aufgezeigt. Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß mit dem Diphenylcarbazonreagens (als unspezifisches Adsorptionsreagens) viele Verunreinigungen aus biologischen Extrakten positiv reagieren. Deshalb muß eine besonders gute Reinigung des Extraktes gefordert werden, um nicht Fehlschlüssen zu erliegen. Das gleiche gilt für die Anwendung der KMnO_4 - Lösung, weil erfahrungsgemäß häufig oxidierbare Verunreinigungen in den Extrakten auftauchen.

Tabelle 14

Übersicht über das Verhalten verschiedener saurer und neutraler Arzneistoffe bei der Behandlung mit Reagenzien auf der Dünnschicht

Es wurden je 20 µg Arzneistoff aufgetragen
(Zusammengestellt nach CURRY (69), verändert nach eigenen Untersuchungen)

Arzneistoff	Schwarzfärbung mit $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$	Diphenylcarbazon	Entfärbung von KMnO_4 (Gelbf.)
Barbiturate mit gesättigter Seitenkette (incl. Phenyl)	+	+ violett	-
Barbiturate mit Allylgruppen in der Seitenkette	+	+ blau	+++
Barbiturate mit wenig aktiven Doppelbindungen in der Seitenkette	+	+ violett	++
Barbiturate mit β -Bromallyl-Seitenkette	+	+ violett	+
N-methylierte Barbiturate	(+)	+ violett	-
Thiobarbiturate	(+)	+ blau	++
Hydantoine	+	+ violett	-
Glutethimid	+	+ blau	+
Ethinamat	+	+ blau	+
Alkinole	(+)	+ violett	-

+++ sehr stark positiv/ ++ stark positiv/ + positiv/
(+) schwach positiv/ - negativ.

Der in der Literatur häufig empfohlene Test im ultravioletten Licht ist für biologische Extrakte nur mit sehr großer Vorsicht anwendbar. Gewöhnlich wird bei diesem Test so verfahren, daß entweder die dünnschichtchromatographische Platte mit einem Fluoreszenzreagens (Fluorescein, Rhodamin B) besprüht wird oder daß bereits dem Kieselgel bei der Bereitung der Schicht unlösliche anorganische und organische Fluoreszenzindikatoren (Leuchstoff ZS Super, Eosin, neuerdings fertig im Handel als Kieselgel G_{254 + 366}) zugesetzt werden und später nach der Entwicklung die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm und bei 366 nm registriert wird. Dabei kann man häufig durch Verunreinigungen bedingte Fluoreszenzlöschungen und auch positive Fluoreszenzen beobachten. Sie stören ganz erheblich den Nachweis der getrennten Arzneistoffe und können zu Verwechslungen Anlaß geben.

Nach Abschluß der Arbeit wurde ein weiteres Detektionsreagens zum spezifischen Nachweis von Barbituraten auf Dünnschichtchromatogrammen bekannt. Die zum Nachweis der Purine bekannte Reaktion der Bildung von Murexid gelingt unter bestimmten Voraussetzungen nach WEICHSEL (70) auch bei den Barbitursäurederivaten. Es können Barbiturate und Thiobarbiturate in Konzentrationen bis 5 µg nachgewiesen werden. Allerdings reagieren die N-methylierten Barbiturate nicht.

Ein weiteres universal anwendbares Reagens für saure und neutrale Arzneistoffe stellt das von RYDON und SMITH (71) 1952 zunächst für andere Substanzen auf Papierchromatogrammen entwickelte Reagens dar. Es handelt sich dabei um eine Behandlung des Papierchromatogramms mit Chlorgas und anschließendem Besprühen mit chlornachweisenden Verbindungen. Zunächst werden bei der Einwirkung von Chlorgas auf N-haltige Substanzen labile N-Cl Verbindungen gebildet. Durch eine nachfolgende Behandlung mit Warmluft werden die gleichzeitig in dem Papier erzeugten O-Cl Verbindungen zerstört. Aus den labilen N-Cl Verbindungen wird

das Chlor durch Einwirkung einer Kaliumjodidlösung freigemacht, es entsteht elementares Jod, das durch verschiedene Reagenzien (Stärke, Redoxindikatoren) sichtbar gemacht wird. VIDIC (72) hat 1959 die Anwendung dieser Reaktion für den Nachweis von barbitursäurefreien Hypnotica und Sedativa beschrieben. Als Reagens wird eine Kaliumjodid - Essigsäure - Benzidin - Lösung verwendet. Die Empfindlichkeit liegt dabei bei 5 μg in der Papierchromatographie.

Auch zum Nachweis der sauren und neutralen Substanzen auf der Dünnschicht wird dieses Reagens oft beschrieben. Als Redoxindikatoren auf freies Jod finden Benzidin und Tolidin Verwendung.

Für die eigenen Untersuchungen war es angezeigt, verschiedene Nachteile dieses Reagenses zu beheben. Interessant war zunächst, daß in der Literatur verschiedene Zeiten für die Chlorierungsdauer der Dünnschichtchromatographie-Platten beschrieben werden. Als Extremfälle seien hier herausgestellt: STAHL (8), Chlor - Tolidin - Test 15 Minuten - LINDFORS und RUOHONEN (64), Chlor - Benzidinacetat 1 Minute. Bei der Nachprüfung der verschiedenen Methoden stellte sich heraus, daß die Chlorkonzentrationen, denen die Platten ausgesetzt waren, stark differierten. Nach Einstellung einer konstanten Chlorgaskonzentration durch längeres Einleiten von Chlorgas in das Einwirkungsgefäß wurden immer noch Unterschiede in der Chlorierungsdauer beobachtet. Es konnte nachgewiesen werden, daß die von bestimmten Laufmitteln in der Trägerschicht verbliebenen Reste die Chlorierungsdauer stark beeinflussen. Wurde z.B. Butanol als Fließmittel verwendet, konnte eine viel kürzere Chlorierungsdauer für den positiven Nachweis beobachtet werden. Offenbar mußte ein bestimmter Feuchtigkeitsgehalt (Butanol - Wasser - Gemische sind erfahrungsgemäß durch Liegenlassen der Dünnschichtchromatographie - Platten an der Luft aus der Dünnschicht schwer entfernbar) eine Verkürzung der Chlorierungsdauer bewirkt haben. Auf

Platten, die mit einem NH_3 - haltigem Fließmittel entwickelt worden waren, wurden häufig Mißerfolge beobachtet, wenn die Platten nicht längere Zeit im Trockenschrank erhitzt worden waren. Es läuft dann folgende Reaktion ab:

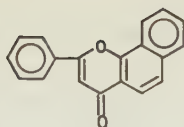


Deshalb wurden bei den folgenden Versuchen die entwickelten Dünnschichtchromatographie - Platten vor der Chlorierung immer eine halbe Stunde im Trockenschrank auf 120°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Platten dann mit wenig destilliertem Wasser besprüht und unter dem Föhn so weit getrocknet, daß keine Transparenz mehr sichtbar war.

Ein weiterer Nachteil der beschriebenen Reagenzien war die Labilität der Färbung. Abgesehen davon, daß schon geringste Verunreinigungen auf der Dünnschichtchromatographie zu positiven Reaktionen führten, war die erzielte Färbung nur ungefähr 1 - 2 Minuten beständig und die Flecken mußten sofort markiert werden. Es war daher wünschenswert, das Reagens in der Weise zu modifizieren, daß die geschilderten Nachteile nicht auftraten.

Als Reagens auf aktives Chlor (bzw. eigentlich das freie Jod nach der Oxidation von Jodid zum Jod durch das Chlor) wird von GILCREAS et al. (73) sowie von H.SCHMIDT (74) α -Naphthoflavin (7,8 - Benzoflavin) erwähnt. Diese Verbindung reagiert mit freiem Jod zu einer blauvioletten Adsorptionsverbindung. Eine systematische Variation der Konzentrationen von Kaliumjodid und von α -Naphthoflavin führte schließlich zur Entwicklung eines neuen Reagenses. Für den Nachweis mit diesem Reagens wird folgende Arbeitsvorschrift gegeben:

Die Dünnschicht - Platten werden eine halbe Stunde lang nach dem Entwickeln bei 120°C getrocknet. Nach dem Abkühlen werden sie mit destilliertem Wasser angesprüht und ganz kurz unter dem Föhn mit Warmluft getrocknet. Sodann werden sie in ein durch längeres Einleiten mit Chlor-



α -Naphthoflavon, 7,8-Benzoflavon, $C_{19}H_{12}O_2$, MG. 272,28.

gas gut gefülltes Entwicklungsgefäß gestellt. Einwirkungs-
dauer für saure Verbindungen - 2 Minuten - für Neutral-
stoffe 45 Sekunden. Die Zeit muß genau mit der Stoppuhr
gemessen werden. Danach werden die Platten ca. 10 Minuten
mit Warmluft behandelt.

Zusammensetzung des Reagenses:

- I. 0,3%ige KJ - Lösung in absolutem Methanol
- II. gesättigte α -Naphthoflavonlösung in absolutem
Methanol (ca. 0,3%ig)
- III. 30%ige Essigsäure

I und II sind in braunen Flaschen aufzubewahren und ca. 1
Monat lang haltbar. Bei Gebrauch werden 6 ml I mit 14 ml II
und 5 ml III gemischt.

Vor dem Ansprühen der ganzen Platte sollte zunächst an
einer Ecke geprüft werden, ob die Untergrundfärbung durch
verbliebene Chlorreste nicht zu stark ausfällt. Sollte
das der Fall sein, so muß die Platte noch weiter mit Warm-
luft behandelt werden.

Die Substanzen erscheinen als blauviolette Flecken auf
schwach rotem Untergrund. Die Nachweisgrenze für die
meisten Barbiturate liegt auf der Dünnschicht bei 1 μ g,
für die meisten Neutralstoffe bei 0,1 μ g. Es reagieren
übrigens nicht allein nur N-haltige Verbindungen, sondern
auch andere (z.B. Methylparafynol). Dieses Reagens wurde
bei den eigenen Versuchen nur für die Detektion der neu-
tralen Arzneistoffe eingesetzt, da nach dem Sprühen mit
diesem Reagens ein Besprühen mit einem anderen Reagens

nicht mehr möglich ist (Blaufärbung). Erst auf einer zweiten Platte kann dann ein spezifisches Reagens angewandt werden.

Die Verwendung des α -Naphthoflavonreagenses zum Nachweis von Arzneistoffen aus Blutextrakten stieß jedoch bei mangelhafter Reinigung der Extrakte auf Schwierigkeiten. Gewisse mitextrahierte Verunreinigungen verursachten starke Schwanzbildungen und verschiedene störende Flecken. Um einen sicheren Nachweis der Arzneistoffe zu gewährleisten, mußte die Reinheit der Extrakte sehr weit getrieben werden. Darauf wird bei der Entwicklung des Reinigungsverfahrens besonders eingegangen.

Als allgemeines Reagens für die Detektion von Neutralstoffen auf Papierchromatogrammen findet das von GÖBEL vorgeschlagene Reagens Silbernitrat - Kaliumdichromat - Natronlauge Verwendung. Eine Nachprüfung für seine Eignung auf Dünnschichtchromatogrammen ergab jedoch einige Mängel. Die Empfindlichkeit für den Nachweis von Arzneistoffen ist recht gering (ca. 30 μ g) und es reagieren auch noch viele Verunreinigungen, die nicht durch das α -Naphthoflavonreagens angezeigt werden, positiv.

Neben den beschriebenen allgemeinen Detektionsreagenzien können zur weiteren Differenzierung der Neutralstoffe verschiedene spezielle Reagenzien eingesetzt werden. Eine Übersicht (Tabelle 15) soll dies demonstrieren. Dabei werden gleichzeitig die Empfindlichkeitsgrenzen der einzelnen Substanzen angegeben. Wie später bei der Beschreibung des Trennungsganges noch ausgeführt werden wird, soll zunächst die Absorption der in Chloroform gelösten Substanzen im UV-Licht geprüft werden. Die Extinktionsmaxima werden in der ersten Spalte angegeben. Die UV-Absorption einer Substanzlösung in 0,1 n-NaOH sollte aber grundsätzlich nur dann vorgenommen werden, wenn mit dieser Lösung weitere Untersuchungen nicht mehr erforderlich sind. In alkalischen Lösungen werden nämlich bestimmte Arz-

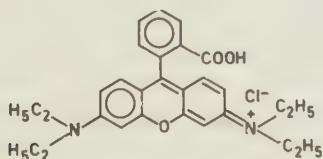
neistoffe schon nach kurzer Zeit mehr oder weniger zerstört. (Glutethimid, Bromharnstoffderivate).

Neben den beschriebenen Reagenzien war es zur Überprüfung der Reinheit der bei dem Reinigungsverfahren gewonnenen Extrakte notwendig, ein möglichst empfindliches, alle lipid- und proteinhaltigen Verunreinigungen anzeigendes Reagens herzustellen, das unspezifisch sein konnte. Ein Adsorptionsreagens schien hierbei besonders gut geeignet zu sein.

Untersuchungen haben ergeben, daß eine Kombination von Quecksilber-I-nitrat mit Rhodamin B sehr gut geeignet war. Um den Untergrund der gefärbten Platten aufzuhellen, war es angezeigt, mit einer Kaliumkarbonatlösung nachzusprühen. Das Reagens war wie folgt zusammengesetzt:

- I. gesättigte wässrige $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ - Lösung (ca. 0,5%ig)
- II. 0,5%ige äthanolische Rhodamin B - Lösung
- III. 10%ige wässrige K_2CO_3 - Lösung.

Die drei Lösungen werden nacheinander auf die Dünnschicht aufgesprüht und unter dem Föhn getrocknet. Dabei kann man zu einem bestimmten Zeitpunkt die maximale Färbung beobachten.



Rhodamin B, N,N,N',N' - Tetraäthylrhodaminchlorhydrat,
 $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{O}_3\text{N}_2\text{Cl}$, MG. 479,00.

Tabelle 15

Übersicht über die Reaktionen mit besonderen Reagenzien der Neutralstoffe

Arzneistoff	UV - Max. Chloroform nm	UV - Max. O, n-NaOH nm	Reagens n. BAÜMLER	Reagens n. DRESSLER	EHRICH's Reagens	Hg ₂ (NO ₃) ₂	HCl u. DRAGENDORFF's Reagens modif.	KJ - J - Lösung u. äthanol. HCl	α -Naphtho- flavon
Carbomal			5 μ g						1 μ g
Acetylcarbomal			5 μ g						1 μ g
Nocturettin			5 μ g						1 μ g
Bromisoval			5 μ g						1 μ g
Methypyrrolon				50 μ g					0,5 μ g
Pyrrithyldion	296					50 μ g			1 μ g
Ethinamat						5 μ g			5 μ g
Glutethimid		235*				10 μ g			1 μ g
Meprobamat					5 μ g				1 μ g
Methylparafynol					1 μ g				1 μ g
Methaqualon	266	263					5 μ g		20 μ g
Acetylsalicyl- säure							10 μ g rotbr.		1 μ g
Phenacetin							5 μ g dkl.br.		0,5 μ g
Acetanilid	241	229							1 μ g
Coffein	275	273						1 μ g, rot	10 μ g
Phenazon	271	256					5 μ g 10 μ g gelbbr.	1 μ g, braun	1 μ g

*wird schnell zerstört

Verzeichnis der in der Tabelle 15 aufgeführten Reagenzien

Reagens nach BÄUMLER (75):

Durch dieses Reagens wird organisch gebundenes Brom nachgewiesen. Aus der organischen Verbindung wird durch UV-Strahlung Brom abgespalten und Brom oxidiert N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin zu einem rotvioletten Farbstoff mit Radikationencharakter (WURSTER's Rot).

- I. 0,5 g N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin-dihydrochlorid wird in einer Natriumäthylatlösung (1 g Na in 100 ml Äthanol) gelöst. Die Lösung muß vor Gebrauch frisch zubereitet werden.

Zunächst wird die Dünnschicht - Platte mit dem Reagens besprüht und danach mit destilliertem Wasser behandelt. Dann wird sie eine Minute den ungefilterten Strahlen einer UV - Lampe ausgesetzt. An den Stellen der bromhaltigen Substanzen entwickeln sich rotviolette Flecken.

Es reagieren positiv: Bromharnstoffderivate und bromhaltige Barbiturate.

Reagens nach DRESSLER (76):

Bei diesem Reagens handelt es sich um ein Ketonreagens. Nach TSCHESCHE erfolgt mit m-Dinitrobenzol in alkalischer Lösung die Abspaltung eines Protons aus der betreffenden Ketonverbindung und Salzbildung des resonanzstabilisierten Carbanions mit der Polynitroverbindung. Der gebildete Farbstoff ist rotviolett.

- I. 2%ige äthanolische m-Dinitrobenzollösung
- II. 2,5 n-KOH in Wasser

Die Platte wird mit Lösung I besprüht und nach dem Trocknen mit Lösung II. Beim vorsichtigen Erhitzen im Heißluftstrom erscheint eine rotviolette Färbung. Bei zu starkem Erhitzen und nach einiger Zeit nimmt die Intensität der Färbung rasch ab. In der Gruppe der Neutralstoffe reagiert nur Methyprylon positiv, obgleich auch andere Verbindungen Ketogruppen enthalten.

EHRlich's Reagens:

Mit p-Dimethylaminobenzaldehyd entstehen in stark saurer Lösung aus primären Aminen gelb gefärbte SCHIFF'sche Basen.

- I. 1%ige p-Dimethylaminobenzaldehydlösung in 20%iger HCL.

Die Dünnschichtplatten werden mit dem Reagens besprüht und im Heißluftstrom erwärmt. Es bilden sich intensiv gelb gefärbte Flecken, wobei auch N-freie Verbindungen wie Methylparafynol positiv reagieren.

HCL - Eisen-III-chlorid - Reagens:

Veresterte Phenole werden durch konzentrierte Salzsäure hydrolysiert und freie phenolische Hydroxylgruppen bilden mit Eisen-III-sulfat farbige Komplexsalze. Es reagieren auch andere Verbindungen nach einem differenten Reaktivschema, z.B. Pyrazolone (Oxidationsprodukte).

- I. konzentrierte Salzsäure
- II. 5%ige $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ - Lösung

Die Dünnschicht - Platten werden nach dem Besprühen mit I 15 Minuten lang auf 120°C erhitzt und nach dem Abkühlen mit II behandelt. Es erscheinen verschieden gefärbte Flecken.

Positiv reagieren: Acetylsalicylsäure, Phenacetin, Acetanilid und Phenazon.

DRAGENDORFF's Reagens modifiziert nach JATZKEWITZ (77):

Mit vielen N-haltigen Verbindungen (vorwiegend basischen) bildet eine essigsäure Wismutnitrat - Kaliumjodid - Lösung intensiv gefärbte Produkte mit höherem Molekulargewicht. In der Modifikation nach JATZKEWITZ zeigt das Reagens nur eine schwache Anfärbung des Untergrundes.

- I. 0,85 g Wismutnitrat werden in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser gelöst.
- II. 8,0 g Kaliumjodid werden in 20 ml Wasser gelöst.

Eine Mischung der Lösungen I und II bildet die Stammlösung, die in einer braunen Flasche aufbewahrt, unbegrenzt haltbar ist. Vor dem Sprühen werden 1 ml Stammlösung, 2 ml Eisessig und 10 ml Wasser miteinander gemischt.

Positive Reaktionen zeigen in dieser Gruppe: Methaqualon und Phenazon.

Jod-Kaliumjodid-äthanolische HCl-Reagens (RANDERATH (9)):

Durch eine Jodausscheidung oder durch eine Jodanlagerung tritt eine Färbung ein. Die äthanolische Salzsäure zerstört die Untergrundfärbung.

I. 1 g Jod und 1 g Kaliumjodid werden in 100 ml Äthanol gelöst.

II. 25%ige Salzsäure und 96%iges Äthanol werden zu gleichen Teilen gemischt.

Zuerst wird Lösung I, sodann Lösung II aufgesprüht.

Es reagieren positiv: Purine mit verschiedenen Färbungen und Phenazon.

5. Die Extraktion der Arzneistoffe aus den Blutproben

Im Abschnitt A 3 sind die Arbeitsmethoden zusammengestellt worden, die zur Extraktion von Arzneistoffen verwendet werden. Bei einer Überprüfung verschiedener in der Literatur beschriebener Methoden war es erforderlich, eine Auswahl nach theoretisch aufgestellten Anforderungen zu treffen.

Grundsätzlich muß folgendes gefordert werden:

- I. Die Extraktion soll für alle untersuchten Substanzen möglichst quantitativ erfolgen.
- II. Der Zeitaufwand für die Extraktion soll im Hinblick auf den weiteren Reinigungs- und Trennungsgang gering sein.
- III. Der gewonnene Rohextrakt soll schon einen relativ guten Reinheitsgrad besitzen.

Um eine geeignete Auswahl unter den angeführten Verfahren treffen zu können, sollen erst die Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren diskutiert werden.

Die im Abschnitt A 3 unter Punkt I genannten Schnellverfahren erschienen zunächst besonders gut geeignet. Eine direkte Ausschüttelung der Blutprobe kann ohne weiteres und ohne Vorbereitungen vorgenommen werden. Bei den eigenen Versuchen wurden 5 ml sicher medikamentenfreies Blut zunächst mit ca. 50 ml Chloroform ausgeschüttelt. Dabei zeigten sich schon technisch erhebliche Schwierigkeiten. Bei frischen Bluten kam es nämlich im Verlauf des Schüttelvorganges zu einer Zusammenballung größerer Blutkoagulate. Ältere Leichenblute bildeten schon nach kurzer Zeit eine sehr starke Emulsion, die nur durch längeres und scharfes Zentrifugieren zu brechen war. Auch bei der Verwendung von länger gelagerten Blutproben von Verkehrsteilnehmern bildete sich schon nach vorsichtigem Schütteln im Scheidetrichter eine feste Emulsion.

Offenbar gelten die angegebenen Methoden der Ausschüttelung von Blutproben nur für ganz frische Proben oder für klinische Untersuchungen.

Ausschüttelungen mit Emulsionsbildung und Zusammenballung von Blutkoagulaten führen aber erfahrungsgemäß zu sehr unvollständigen Extraktionen von Arzneistoffen.

Zur Orientierung über die von verschiedenen Lösungsmitteln aus Blut mitextrahierten Verunreinigungen wurde so verfahren, daß die in Betracht kommenden Lösungsmittel unter Umrühren mit medikamentfreien Bluten (Leerblut) versetzt und ca. 15 Minuten lang gerührt wurden. Die filtrierte Extraktlösung wurde auf dem Wasserbad vorsichtig eingedampft und der Rückstand schließlich auf eine Kieselgel - Dünnschichtchromatographie - Platte aufgetragen. Entwickelt wurde mit dem Fließmittelsystem Chloroform 100, Azeton 5, NH_3 25%ig 10. Die Detektion erfolgte mit dem $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ - Rhodamin B - Kaliumkarbonat - Reagens. Es zeigte sich, daß mit der Zunahme der Polarität der untersuchten Lösungsmittel: Dichlormethan, Chloroform, Äther, Äthylacetat, Azeton die Verunreinigungen signifikant zunahmen. Besonders die Extrakte der wasseraufnehmenden Lösungsmittel wie Äther und Äthylacetat waren sehr stark verunreinigt und es gelang überhaupt nicht, den Extrakt aus 5 ml Blut auf einen Fleck aufzutragen, weil eine Ablösung der Schicht eintrat. Erstaunlicherweise war der Azetonextrakt gegenüber den anderen viel sauberer und weniger gefärbt. Dieser Extrakt mit Azeton wurde später auch für die Ausführung der säulenchromatographischen Versuche verwendet.

Die unter Punkt 2 genannten Verfahren der kontinuierlichen Extraktion scheinen bezüglich der Ausbeuten den besten Erfolg zu bieten. Nicht zu übersehen ist jedoch der beträchtliche Zeitbedarf. Für eine solche Extraktion muß man mit einer Dauer von ca. 6 Stunden rechnen. Außerdem zeigte sich bei wässrigen oder bei gepufferten Blutlösungen mit der Zeit auch eine leichte Emulsionsbildung, die schließlich zu einem Übergang der emulgierten Phasen in die Vorlage und damit zu einer Verunreinigung führte. In Hinblick darauf, daß selbst bei der Ausschaltung der

Emulsionsbildung durch Verwendung stark salzreicher wässriger Lösungen eine gute Veränderung des Verfahrens erzielt werden kann, fördert eine längere Extraktion nicht nur den Anteil des zu extrahierenden Arzneistoffs, sondern auch den Anteil der Verunreinigungen.

Zur Verbesserung dieses Verfahrens sind daher die Vorschläge für eine Kaltextraktion sehr wertvoll. Eigene Versuche, bei denen das überdestillierte Lösungsmittel zunächst wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt wurde und danach erst mit der wässrigen Lösung in Berührung kam, verliefen aber wenig erfolgreich. Wie schon unter Punkt 1 erwähnt wurde, wurden die erhaltenen Extrakte auf Verunreinigungen geprüft. Dabei ergaben sich für die kontinuierliche Extraktion keine Vorteile. Eine Anwendung von mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln war zunächst ausgeschlossen. Wegen der relativen Reinheit der acetonischen Extrakte wurde versucht, zunächst das in der Probe enthaltene Wasser zu entfernen und dann zu extrahieren.

Das Blut wurde also mit verschiedenen anorganischen Salzen verrieben (Natriumsulfat, Ammoniumsulfat u.a.) und das trockene Pulver in den Extraktionsapparat eingefüllt. Eine gute Extraktion war dabei aber auch kaum zu erzielen. Die Durchflußgeschwindigkeit des Lösungsmittels war wegen der Feinheit des Pulvers sehr gering und es bildeten sich in der Schicht des Pulvers Kanäle und Risse, die natürlich eine unvollständige Extraktion bedingten. Ein Zusatz von verschiedenen Arzneistoffen (Carbromal, Pyrrithyldion, Ethinamat und verschiedene Barbiturate) zu einer Salzprobe ohne Blut ergab schließlich, daß besonders die Extraktion der Neutralstoffe unvollständig und bei Carbromal überhaupt nicht möglich war.

Vorversuche zur Extraktion von Arzneistoffen aus Verreibungen mit Florisil mit grobkörnigen Kieselgel und mit Seesand verliefen erfolgreicher. Es kam jedoch bei den beiden ersten Sorptionsmitteln zu einer Adsorption man-

cher Arzneistoffe. Bei der Verwendung von Seesand war zwar die Ausbeute an zugesetzten Arzneistoffen sehr gut, doch wurden wegen der geringen Adsorption der Verunreinigungen und des großen Zeitbedarfs der Methode keine weiteren Versuche unternommen.

Das Aufbringen der Blutprobe auf einen Trägerstoff wie unter Punkt 3 ausgeführt, hat recht viele Vorteile. Das in der Blutprobe vorhandene Wasser wird gebunden, eine Zusammenballung von Blutkoagulaten ist nicht mehr möglich und der Trägerstoff kann so ausgewählt werden, daß zwar eine Adsorption von Eiweißen und Fetten an den Träger stattfindet, daß aber Arzneistoffe nicht adsorbiert werden. Auch hier erwies es sich, wie bei den Versuchen zur kontinuierlichen Extraktion, daß Neutralstoffe entweder teilweise oder sogar vollständig an anorganische Salze adsorbiert werden. Offenbar wird gleichzeitig mit der Wasseraufnahme aus der Extraktionsflüssigkeit der im Wasser gelöste Arzneistoff in das Kristallwasser eingeschlossen und ist daher nicht mehr extrahierbar. Außer den im Punkt 3 genannten Trägerstoffen kommen natürlich viele für die Säulenchromatographie verwendete Sorptionsmittel in Frage. Man kann gemäß STRAIN (78) die Sorptionsmittel nach steigender Adsorptionskraft ordnen:

Saccharose, Stärke
 Inulin
 Magnesiumzitrat
 Talkum
 Natriumkarbonat
 Kaliumkarbonat
 Kalziumkarbonat
 Kalziumphosphat
 Magnesiumkarbonat
 Magnesia (Merck)
 Aktivierte Kieselsäure
 Aktiviertes Magnesiumsilikat
 Aktiviertes Aluminiumoxid
 Aktivierte Tierkohle
 Aktivierte Magnesia

Zu dieser Aufstellung ist zu bemerken, daß das bei den eigenen Versuchen verwendete Florisil in der Aktivität zwischen Kieselsäure und Magnesia (Merck) einzuordnen ist

und das Kieselgur etwa die Aktivität des Talkums besitzt. Natürlich kann die Aktivität der genannten Sorbentien durch Wasserzusatz sehr stark verändert werden.

Zunächst wurden bei den eigenen Versuchen wässrige Arzneistofflösungen mit den Sorptionsmitteln verrieben und anschließend mit verschiedenen Lösungsmitteln (Dichlormethan, Chloroform, Äthylacetat, Äther, Aceton, Methanol) extrahiert. Bei bestimmten Arzneistoffen wie Meprobamat, Ethinamat, Phenacetin war eine Desorption nur mit relativ polaren Lösungsmitteln von inaktiven Adsorbentien möglich. Die sauren Substanzen waren dagegen von relativ aktiven Sorptionsmitteln wie Kieselgel oder Aluminiumoxid Aktivität III (nach BROCKMANN und SCHODDER (79)) recht leicht durch unpolare Lösungsmittel wie Chloroform desorbierbar. Auch die Reinheit des Blut - Kieselgel - Chloroformextraktes war sehr gut. Es war jedoch unmöglich, Neutralstoffe wie Ethinamat und Phenacetin auch durch Anwendung stark polarer Elutionsmittel mit Säurezusatz aus einer Kieselgelverreibung zu extrahieren.

In Hinblick darauf wurde ein schwach aktives Sorptionsmittel (Kieselgur) gewählt, von dem alle Neutralstoffe mit einem polaren Lösungsmittel desorbierbar waren. Es lag nahe, hier die bereits erwähnten vorteilhaften Eigenschaften des Azetons einzusetzen und sie mit denen des Kieselgur zu kombinieren. Zur Erhöhung der Ausbeute an Arzneistoffen erwies es sich als vorteilhaft, eine Säure zuzusetzen. Verschiedene anorganische Säuren (Salzsäure, Salpetersäure) und organische Säuren (Ameisensäure, Essigsäure) wurden der Verreibung zugesetzt und dann mit Azeton extrahiert. Diese Säuren hatten den Nachteil, daß sie in Azeton löslich sind und schließlich beim Eindampfen des Azetonextrakts in konzentrierter Form anfallen. Durch die Einwirkung von konzentrierten Säuren auf die Arzneistoffe kann es dann ohne weiteres zu einer Artefaktbildung kommen. Eine stark sauer reagierende Lösung eines anorganischen Salzes vermeidet diese Nachteile. So ist z.B. Natrium-

bisulfat in Azeton unlöslich. Schon ein Zusatz von 1 ml einer 10%igen Natriumbisulfatlösung erhöht die Ausbeute beim Zusatz zur Verreibung bei Ethinamat von 10% auf 60% und beim Phenacetin von 50% auf 85%.

Für den ersten Extraktionsschritt wird also folgende Arbeitsvorschrift vorgeschlagen:

5 ml Blut werden mit 4 g Kieselgur innig verrieben. Zu der Verreibung wird 1 ml 10%ige Natriumbisulfatlösung hinzugegeben. Die Verreibung wird in einen Erlenmeyerkolben überführt, in dem sich etwa 50 ml Azeton befinden. Die Suspension wird mit einem schnelltourigen Homogenisator ungefähr 1 Minute lang homogenisiert. Danach werden weitere 50 ml Azeton hinzugefügt und mechanisch 15 Minuten lang gerührt. Die Azetonsuspension wird dann durch einen Blauband Faltenfilter hart 9 cm Durchmesser filtriert. Der Extrakt wird mit 0,1 g Aktivkohle versetzt und nach dem Umrühren erneut durch einen Faltenfilter gleicher Art filtriert. Die Gefäße werden zweimal mit Azeton nachgespült und sodann zum Nachspülen der Filter verwendet. Der Azetonextrakt wird endlich in einen starkwandigen Rundkolben überführt und bei 40° C im Vakuum (Vakuumrotationsverdampfer) eingengt. Der Rückstand im Kolben wird durch zweimaliges Waschen mit 5 ml Azeton und einmaliges Waschen mit 10 ml Wasser in eine Abdampfschale gespült. Diese Lösung ist der Rohextrakt.

Anforderungen an die Reinheit des Azetons:

Handelübliches Azeton D A B 6 wird einmal unter Zusatz von Natriumhydroxid in Rotuliform destilliert.

Anforderungen an die Reinheit des Kieselgurs:

Kieselgur (Terra silicea Merck, säuregewaschen und ge-
glüht) wird im Soxhletapparat 6 Stunden heiß mit Azeton extrahiert.

Die unter Punkt 4 genannten Verfahren haben den großen Vorteil, daß gleich zu Beginn des Reinigungs- und Extraktionsverfahrens Eiweiß, viele Fette und Lipide entfernt

werden. Eine Ausschüttelung des gewonnenen Extraktes ist dann ohne Emulsionsbildung möglich.

Einige schwerwiegende Nachteile sprechen aber gegen diese Art des Reinigungsverfahrens. Der nach der Fällung gewonnene Extrakt ist wässrig. Viele Arzneistoffe (Barbitale, Bromharnstoffderivate) sind aber in Wasser sehr schwer löslich. Es ist deshalb sehr gut möglich, daß diese Substanzen zum großen Teil in der Fällung zurückbleiben und nur unvollständig in die wässrige Phase übergehen. Bei eigenen Versuchen stellte es sich heraus, daß auch andere Arzneistoffe, die gut wasserlöslich sind, in dem Koagulat zu einem großen Teil eingeschlossen werden und nicht mehr in Lösung gehen. STREET (47) schlägt deshalb vor, nach dem Homogenisieren des Koagulats die Suspension 15 Minuten lang im Wasserbad zu erhitzen. Für viele Arzneistoffe scheint diese Behandlung in stark saurer Lösung zu einer Hydrolyse zu führen. Außerdem ergaben eigene Versuche mit Barbituraten, daß die Rückgewinnungsquote sehr gering war (Ausbeuten von 30 - 40%). Auch durch den Einsatz von anderen Eiweißfällungsmitteln wie Trichloressigsäure, Uranylacetat, Metaphosphorsäure, Perchlorsäure, Pikrinsäure, Wolframmolybdänsäure können keine besseren Resultate erzielt werden. Die häufig vorgeschlagene Zink- (HAGEDORN und JENSEN (80)) und Cadmiumhydroxid - Fällung (FUJITA und IWATAKE (81)) ergibt noch schlechtere Ergebnisse. Wenn dennoch im späteren Verlaufe des Reinigungsverfahrens eine Schwermetallhydroxidfällung eingesetzt wird, so ist das durchaus sinnvoll. Nach Ausfällung der Eiweißstoffe und der meisten Lipide kann nämlich solch eine Fällung ohne Arzneistoffverlust angewendet werden.

6. Die Vorversuche zur Reinigung der Rohextrakte

I. Säulenchromatographische Versuche

Zur Reinigung der Extrakte aus biologischem Material und zur gleichzeitigen Auftrennung von sauren und neutralen Arzneistoffen sind von verschiedenen Seiten Vorschläge gemacht worden.

PAULUS und MALLACH (82) sowie de TIEGE - ROBINET (83) beschreiben die Reinigung von Extrakten der Barbitursäurederivate mit Hilfe der Adsorptionschromatographie.

FISCHER und IWANOFF (84) beschäftigen sich mit der Adsorbierbarkeit von Schlafmitteln an verschiedene Adsorbentien. Man kann daraus entnehmen, daß an Aluminiumoxid bei Anwendung von Chloroform und Äther die meisten Schlafmittel adsorbiert werden. An anderen Adsorbentien wie Kohle, Kalziumkarbonat, Bolus und Talkum findet keine Adsorption statt.

MacCALLUM (85) berichtet von Versuchen zur Abtrennung des Megimids von einem Metaboliten an einer Aluminiumoxidsäule. Der gleiche Autor benützt für die Barbiturate ebenfalls Aluminiumoxid und zur Elution Chloroform.

TSUKAMOTO et al. (86) erproben für die Barbiturate eine Aluminiumoxidsäule und eluieren mit Azeton.

Zur Reinigung von Barbitursäureextrakten aus biologischem Material verwenden DEININGER (87) Aluminiumoxid - Kohle - Säulen und BRUNDAGE und GRUBER (88) Säulen mit Aktivkohle.

Nach VIDIC (46) dient eine Aluminiumoxidsäule Akt. III basisch zur Reinigung eines Blutextraktes bei der quantitativen photometrischen Bestimmung des Glutethimids.

Für die Reinigung eines Rohextraktes der Barbiturate aus Blutproben wird von VIDIC (89) eine Aluminiumoxid - Säule bei Elution mit Aceton und danach eine Kieselgel - Kohle - Säule empfohlen, die mit Äther eluiert wird.

In neuer Zeit verdient ein von STOLMAN (90) und STEWART

beschriebenes und von STOKES et al. (91) weiter entwickeltes Verfahren Beachtung, bei dem Florisil - Säulen zur Vorreinigung von Blutextrakten Verwendung finden. PETZOLD et al. (92) untersuchen die Anwendbarkeit der Florisil - Säulen zur Reinigung der Blutextrakte bei einer größeren Anzahl von Barbituraten. Bei Modellversuchen erhalten sie gute quantitative Ausbeuten bei Verwendung der Florisil - Kolonne und Chloroform - Azeton 9 : 1 als Elutionsmittel. Außerdem gelingt dabei noch die Abtrennung der bei der Spektrophotometrie störenden Salicylsäure.

Auch die Reinigung und Auftrennung von Arzneistoffen mit Hilfe der Verteilungschromatographie ist bearbeitet worden. Verschiedene Arzneistoffe lassen sich, wie von HEUERMAN und LEVINE (93) vorgeschlagen wird, von Hilfsstoffen reinigen und trennen, wenn eine Celite - Säule verwendet wird, die mit Natriumbikarbonat, Trikaliumphosphat, Schwefelsäure und Weinsäure imprägniert ist. Dabei werden Acetylsalicylsäure, Coffein, und organische Basen jeweils aus dem Gemisch entfernt.

Die Chromatographie an Ionenaustauschern erscheint auch für die toxikologische Analyse ohne weiteres anwendbar.

VINCENT und BLAKE (94) setzen aus den Barbituratsalzen nach Passage durch eine Amberlite IRC 50 - Kolonne die Säuren frei. JINDRA und BALAK (95) erzielen gute Ergebnisse bei der Verwendung von Anionenaustauschern (Amberlite IRA 400, Lewatit MN) ebenso wie KAWAHARA (96).

Umfassend wird die Anwendung der Adsorptionschromatographie und die Verteilungschromatographie für die Reinigung und Auftrennung der Barbiturate und der neutralen Schlafmittel von WEIDMANN (97) untersucht.

Zunächst wird der Harnrohextrakt an einer Kieselgel - Aktivkohle - Kieselgel - Säule gereinigt. Es gelang dann, verschiedene Barbiturate von einigen Neutralstoffen an einer mit Eisessig vorbehandelten Aluminiumoxidsäule Akt. I sauer mit Äther - Eisessig 98 : 2 halbquantitativ abzu-

trennen. Carbromal und Bromisoval werden dabei jedoch nicht eluiert. Bei Verwendung von Aluminiumoxid Akt. III basisch und Äther - Äthanol 97 : 3 als Elutionsmittel konnten die Neutralstoffe von den Barbituraten abgetrennt werden. An Kieselgelsäulen und an mit Natriumkarbonat imprägnierten Zellosesäulen wurden Auftrennungen innerhalb der Gruppen der Barbiturate und der Neutralstoffe vorgenommen.

Für die Anwendbarkeit der aus der Literatur bekannten Ergebnisse auf die eigene Problemstellung war es wichtig, durch Versuche festzustellen, ob die im Folgenden aufgestellten Forderungen alle vollständig zu erfüllen waren:

1. Die in der Literatur beschriebenen Verfahren gelten meist nur für eine bestimmte Gruppe von Verbindungen. Für eine Reinigung durch eine Säule muß gefordert werden, daß alle in Frage kommenden Verbindungen die Säule verlustlos passieren. Dabei ist es zunächst gleichgültig, ob die Säule zur Auftrennung verschiedener Substanzen geeignet ist, weil später auf Grund anderer Verfahren wie z.B. der Dünnschichtchromatographie eine Auftrennung vorgenommen werden soll.
2. Die säulenchromatographischen Verfahren sind überwiegend für Trennungen im Milligrammbereich ausgearbeitet worden. Für die Anwendbarkeit auf den für die vorliegende Arbeit geltenden Mikromaßstab müssen sie auf den Gamma - Bereich übertragbar sein.
3. Viele der beschriebenen Verfahren sind für die Reinigung von Harnextrakten entwickelt worden. Erfahrungsgemäß enthält ein Extrakt aus einer Blutprobe andere und weit mehr Verunreinigungen. Die Reinheit des nach der Passage durch eine Säule gewonnenen Extraktes soll aber mindestens genau so gut wie die des Harnextraktes sein.

Für die eigenen Versuche wurden aus der Reihe der angeführten Sorptionsmittel Aluminiumoxid, Kieselgel, Magne-

siumsilikat, Florisil (standardisiertes Magnesiumsilikat) und Zellulosepulver (imprägniert) ausgewählt. Aus der Reihe der zu untersuchenden Substanzen wurden bestimmte Modellsubstanzen ausgewählt; diese werden bei den Versuchen jeweils angeführt. Bei den Barbituraten sind Analogieschlüsse über das chromatographische Verhalten eher möglich als bei den Neutralstoffen, bei denen wegen der chemischen Verschiedenartigkeit der Verbindungen nur sehr vorsichtige Schlüsse möglich sind.

Bei den säulenchromatographischen Versuchen wurde immer so vorgegangen, daß zunächst die adsorptionslose Passage der sauren und neutralen Arzneistoffe erprobt wurde und danach die Reinigungswirkung gegenüber einem Azetonextrakt beurteilt wurde.

Es wurden jeweils Mengen von 100 µg der Arzneistoffe eingesetzt und im Eluat die Substanz halbquantitativ bestimmt. Das wurde so vorgenommen, daß der in Alkohol - Azeton aufgenommene Verdampfungsrückstand des Eluates mit einer von 10 zu 10 µg ansteigenden Testreihe der gleichen Substanz auf eine Kieselgel - Dünnschicht - Platte aufgetragen und in dem System Chloroform - Azeton - NH_3 25%ig 100 : 5 : 10 entwickelt wurde. Als Detektionsreagens fand das α -Naphthoflavinreagens Verwendung. Anhand der Abstufung der Färbung und der Fleckengröße wurde die Ausbeute geschätzt. Das gelingt bei einiger Übung auf 5 µg genau.

Für Sorptionsmittel der Säulenchromatographie wurde zur orientierenden Übersicht zunächst eine Dünnschicht - Platte angefertigt. Allerdings wurde wegen der sehr langen Laufzeit einer Magnesiumsilikatplatte auf eine solche Vorprobe verzichtet.

Zur Untersuchung des chromatographischen Verhaltens von Barbituraten und Neutralstoffen wurden zunächst Dünnschicht - Platten mit Aluminiumoxid sauer, aktiviert, mit dem Laufmittel Äther - Äthanol 97 : 3 (nach WEIDMANN (97)) werden Neutralstoffe hierbei nicht adsorbiert) entwickelt.

Phenobarbital sowie Methaqualon und Glutethimid befanden sich an der Fließmittelfront, während die anderen Neutralstoffe im R_f - Bereich 80 - 100 ($R_f \times 100$) verteilt waren. Bei der Anwendung von Azeton als Fließmittel wanderten alle Substanzen an die Fließmittelfront und es war daraus zu entnehmen, daß bei der Aluminiumoxidsäule sauer alle betrachteten Substanzen quantitativ von der Säule mit diesem Lösungsmittel desorbierbar sind.

Es zeigte sich aber bei der Übertragung auf die Säule, daß diese Verhältnisse hier nicht zutrafen. Bei der Entwicklung von sauren Substanzen wie Phenobarbital und Barbitat konnten zwar Ausbeuten von 80 - 95 % erzielt werden, bei Neutralstoffen wie Pyrrithyldion, Carbbromal waren bei Anwendung von Azeton als Entwicklungsflüssigkeit nur 20 - 40 % wiederzufinden (Ausnahme: Methaqualon 90%); Meprobbamat und Phenacetin waren überhaupt nicht desorbierbar.

Zur Erklärung dieses Ergebnisses kann man anführen, daß die Aktivität der Säule und der Dünnschicht - Platte nicht übereinstimmen und daß sich wahrscheinlich innerhalb einer nach außen hin als sauer erscheinenden Aluminiumoxidsäule noch gewisse wenige, aktive basische Zentren befinden, die die passierenden schwach sauren Arzneistoffe ähnlich wie ein Ionenaustauscher festhalten. Sie sind dann nur mit sehr stark polaren Elutionsmitteln desorbierbar.

Da jedoch wegen der geringen Reinigungswirkung einer weitgehend desaktivierten Aluminiumoxidsäule und bei Anwendung von noch polareren Lösungsmitteln als Azeton weitere Versuche in dieser Richtung aussichtslos erscheinen, wurde versucht, eine Kieselgelsäule mit Äther zu eluieren, wie von WEIDMANN (97) beschrieben.

Zwar wanderten bei einem Vorversuch auf der Dünnschicht alle Substanzen bei Anwendung von Äther an die Fließmittelfront, doch waren bei der Säule nur Methyprrylon, Pyrrithyldion und Methaqualon ohne große Verluste wiederzugewinnen, während Carbbromal und Bromisoval teilweise und

Phenacetin, Meprobamat und Ethinamat vollständig adsorbiert blieben. Auch durch Azeton als Elutionsmittel konnte keine wesentliche Änderung herbeigeführt werden.

Weitere umfangreiche Versuche wurden mit Magnesiumsilikat- und mit Florisilsäulen unternommen. Bei diesen Säulen wurde wie von WEIDMANN (97) beschrieben, eine Säule mit 5 g Sorptionsmaterial in eine Glassäule mit inneren Durchmesser von 10 mm naß eingefüllt. Aus der Differenz zwischen dem anfangs eingefüllten Elutionsmittel und der nach dem Einfüllen der Säule bis zur Oberfläche des Sorptionsmittels abgelaufenen Flüssigkeitsmenge wurde das Totvolumen der Säule bestimmt. Jede Säule wurde mit 30 ml Elutionsmittel vorgewaschen. Die zu untersuchende Substanz wurde jeweils in Mengen von 100 µg in der entsprechenden Elutionsflüssigkeit gelöst und ca. 2 ml dieser Menge auf die Säule gegeben. Nach dem Einsickern wurde dann die Elutionsflüssigkeit zunächst in kleinen Portionen aufgebracht. Zuerst wurde Chloroform zur Entwicklung benutzt. Dabei bleiben die meisten Substanzen mit Ausnahme von Methaqualon, das zu 90% wiedergefunden wurde, auf der Säule adsorbiert. Auch durch Zusatz von Äther und Methanol gesättigt mit NH_3 konnten nicht alle Arzneistoffe aus der Säule gewaschen werden. Eine Übersicht soll das demonstrieren (Abb. 6).

Im Rahmen der Problemstellung kann daher solch eine Säule nicht verwendet werden, da einige Arzneistoffe irreversibel auf der Säule adsorbiert bleiben. Da jedoch die Säule eine recht gute Reinigungswirkung für Azetonextrakte zeigt, ist es möglich, bei scharf umgrenzten Fragestellungen (Suche nach einem Arzneistoff, der die Säule passiert) eine Magnesiumsilikatsäule zur Vorreinigung zu verwenden.

Bei den Versuchen mit einer Florisilsäule wurde Florisil der Fa. Serva, 100 - 200 mesh, aktiviert, verwendet. Diese besondere Art des Magnesiumsilikats hat wegen der genormten Korngröße eine bessere Durchflußgeschwindigkeit als das Präparat von Woelm. Bezüglich der Barbiturate

konnten die Versuche von STOKES et al. (91) bei Verwendung von Chloroform - Methanol 9 : 1 als Elutionsflüssigkeit bestätigt werden. Durchschnittlich konnten bei Phenobarbital, Cyclobarbital und Pentobarbital Ausbeuten von 95% beobachtet werden.

Bei den Neutralstoffen wird bei Anwendung von Chloroform nur Methaqualon mit den ersten 50 ml des Eluates quantitativ eluiert. Bei der Verwendung von Chloroform - Methanol 9 : 1 werden nicht nur Barbiturate quantitativ eluiert, sondern auch Acetanilid zu 95%, Antipyrin zu 85%, Phenacetin zu 90%, Diphenylhydantoin zu 90%, Pyridylidion zu 95% und Methypylon zu 95%. Durch Chloroform - Äther - Methanol (6 : 4 : 0,5) lassen sich die Bromharnstoffderivate sowie Glutethimid fast quantitativ zurückgewinnen. In einer Übersicht sind die Elutionsverläufe bei Anwendung verschiedener Lösungsmittel angegeben (Abb. 5).

Um eine Steigerung der Reinigungswirkung der Florisilsäule herbeizuführen, war es erforderlich, der Füllung 0,1 g Aktivkohle hinzuzusetzen.

Leider gelang es auch hier nicht, bestimmte Arzneistoffe quantitativ zu desorbieren; manche blieben völlig adsorbiert. So ließ sich Coffein bei Anwendung einer Chloroform - Äther - Diäthylamin (6 : 4 : 0,5) - Mischung nur zu 48% wiederfinden. Ethinamat und Meprobamat waren auch beim Aufbringen von sehr stark polaren Lösungsmitteln wie Methanol, gesättigt mit NH_3 , nicht oder nur zu einem ganz geringen Prozentsatz aus der Säule rückgewinnbar. Die Reinigungswirkung einer Florisilsäule, die mit solchen polaren Lösungsmitteln extrahiert wird, ist begreiflicherweise nur sehr gering.

Deshalb wurde in Hinblick auf die eingangs aufgestellten Forderungen auf eine Anwendung einer Florisil - Kolonne verzichtet.

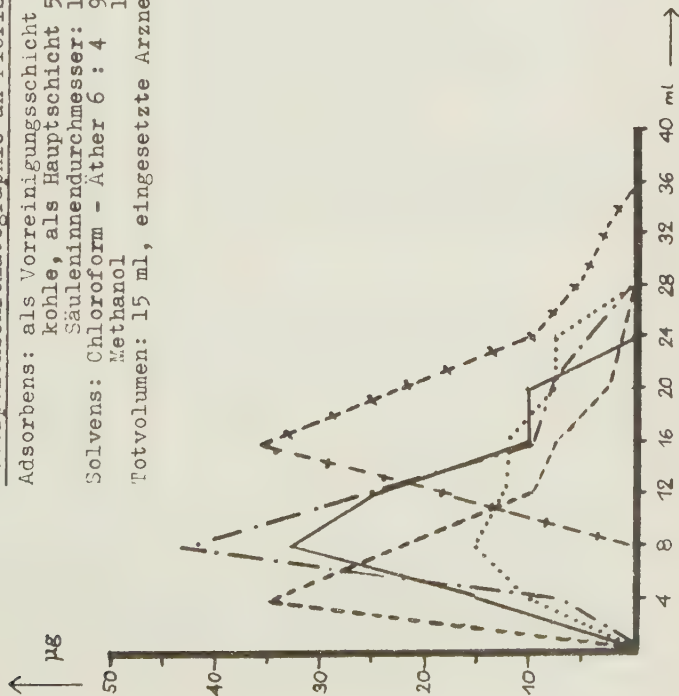
Bei der Zellulose - Natriumcarbonat - Säule nach WEIDMANN wurde in Abweichung des bisherigen Verfahrens zunächst

einmal die Reinigungswirkung gegenüber einem Azeton - Blut - Extrakt getestet. Dabei zeigte sich, daß sie nur eine ganz geringe Reinigungswirkung hatte, außerdem tauchten die meisten Verunreinigungen in den Fraktionen auf, in denen sich die Arzneistoffe befinden sollten. Daher wurde auch in dieser Richtung eine weitere Ausdehnung der Versuche unterlassen.

Abb. 5

Adsorptionschromatographie an Florisil „Serva“

Adsorbens: als Vorreinigungsschicht 3 g Florisil + 0,1 g Aktivkohle, als Hauptschicht 5 g Florisil
 Säuleninnendurchmesser: 10 mm
 Solvens: Chloroform - Äther 6 : 4 90 Vol. Teile
 Methanol 10 Vol. Teile
 Totvolumen: 15 ml, eingesetzte Arzneistoffmenge: 100 µg.



— Carbromal
 Nocturetten
 --- Glutethimid
 - · - · - Pyriethyldion
 - + - + Methyprylon

Nicht adsorbiert:
 Barbiturate, Methaqualon
 Adsorbiert, bleiben:
 Ethinamat, Meprobamat

Abb. 6

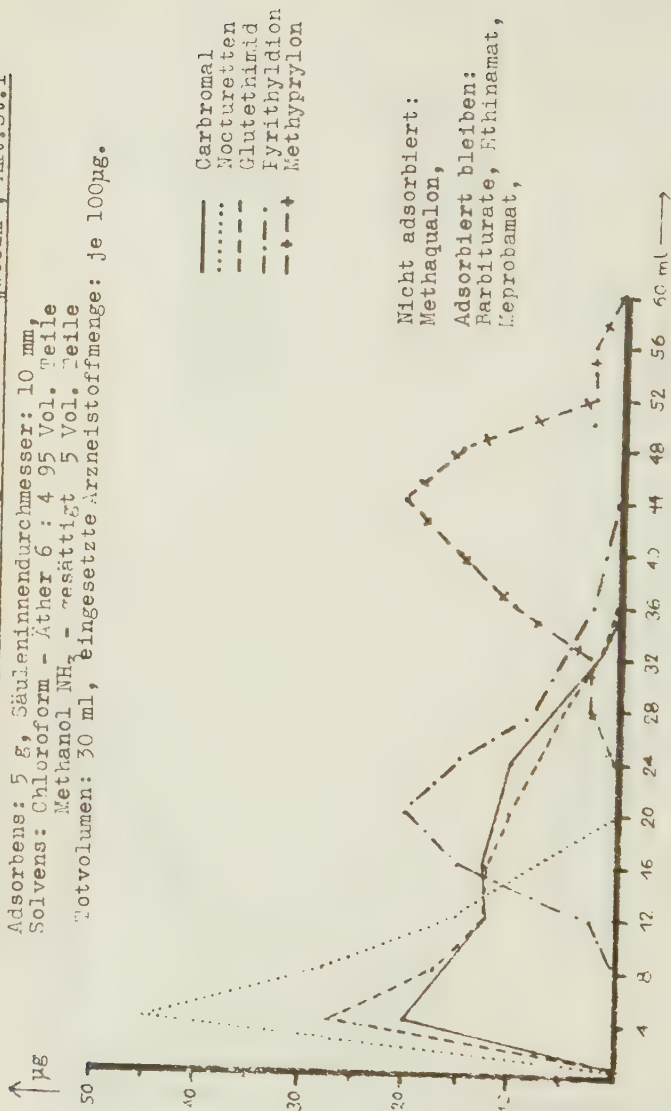
Adsorptionschromatographie an Magnesiumsilikat „Noelm“, Akt.St.I

Adsorbens: 5 g, Säuleninnendurchmesser: 10 mm,

Solvens: Chloroform - Äther 6 : 4 95 Vol. Teile

Methanol NH_3 - gesättigt 5 Vol. Teile

Totvolumen: 30 ml, eingesetzte Arzneistoffmenge: je 100 μg .



II. Anwendung der Dünnschichtchromatographie zur Reinigung biologischer Extrakte

In der neueren Zeit mehren sich die Vorschläge verschiedener Autoren, die die Dünnschichtchromatographie als präparative Methode zur Reinigung von Extrakten verschiedener Herkunft vorschlagen. Auch in der Toxikologie hat diese Methode Anwendung gefunden (PAULUS (98), MACHATA (99)). Bisher wurde dabei nur die Adsorptionschromatographie angewendet.

Es lag nahe, zur Reinigung des biologischen Extraktes auch hier die präparative Dünnschicht einzusetzen. Aus den Untersuchungsergebnissen der Säulenchromatographie ging hervor, daß man bei Verwendung von Aluminiumoxid oder Kieselgel mit einer starken Adsorption der Arzneistoffe zu rechnen hat. Wegen des hohen Fett- und Lipidgehaltes des Blut - Azeton - Extraktes wurde daher versucht, ein verteilungschromatographisches Verfahren (eventuell mit umgekehrten Phasen) anzuwenden. Hierfür schien als Trägermaterial Kieselgur und Zellulose geeignet zu sein, das dann mit lipophilen Substanzen imprägniert werden sollte. Daneben wurde noch eine andere Versuchsreihe aufgestellt, bei der die Imprägnierung mit Puffern vorgenommen wurde.

Zunächst wurden Versuche mit Kieselgur durchgeführt. Eine Kieselgur - Dünnschicht - Platte (Kieselgur G Merck) mit einer Schichtdicke von 0,5 mm wurde in Laufrichtung durch Abschaben von 3 ca. 0,5 cm breiten Streifen in 4 3,5 cm breite Streifen eingeteilt. 2 cm vom unteren Rand entfernt wurden nun die Arzneistoffe und ein Blutextrakt aufgetragen. In der Mitte der Kieselgurstreifen, 6 cm vom unteren Rand entfernt und ca. 7 cm breit wurde die Imprägnierung mit den verschiedenen lipophilen Substanzen vorgenommen. Nun wurde wie üblich aufsteigend in einer Normalkammer entwickelt.

Bei der Anwendung einer Paraffinimprägnierung und einer

Methanol - Wasser - Mischung (6 : 4) konnte zwar erreicht werden, daß die meisten Arzneistoffe durch die hydrophobe Schicht hindurch gingen, doch war die Reinigungswirkung gegenüber Blutextrakten außerordentlich gering. Bei einer Imprägnierung der Reinigungszone mit einem Puffer pH 7,4 und Chloroform als Fließmittel war überhaupt keine Reinigungswirkung zu erzielen.

Weitere Versuche wurden mit 0,5 mm dicken Zelluloseschichten (Zellulose MN 300 Schleicher & Schüll) vorgenommen. Hierbei wurde die lipophile Zone mit Paraffin, Palmitinsäure, Stearinsäure und Olivenöl imprägniert. Als Fließmittel diente die oben angegebene Methanol - Wasser - Mischung.

Nachteilig von der technischen Seite her war die lange Fließmittelzeit. Ein Chromatogramm benötigte bis zu 12 Stunden, bis das Fließmittel die obere Kante der Platte erreicht hatte. Daneben war die Reinigungswirkung für Blutextrakte nicht gut, sehr häufig traten gerade bei der Imprägnierung mit Fettsäuren Schwanzbildungen auf. Bei der Imprägnierung mit Olivenöl war es auch nach längerem Durchlauf des Fließmittels nicht möglich, Methaqualon aus der Olivenölzone zu eluieren.

Daneben wurde noch eine Imprägnierung der Zone mit Puffer pH 7,4 und mit Bleinitrat versucht. Auch hierbei konnte keine gute Reinigung erzielt werden.

Die Anwendung der Verteilungs - Dünnschichtchromatographie war demnach für die Lösung des gestellten Problems nicht ausreichend.

III. Verteilung zwischen zwei flüssigen Phasen

Als Probenvorbereitung für die UV - Spektrophotometrie werden von vielen Seiten (REMMER (100), SUNSHINE und GERBER (36)) Verteilungsverfahren zur Reinigung vorgeschlagen. So wird z.B. der Chloroformextrakt der Neutralstoffe mit einem Puffer pH 7 - 8 und bei sauren Substanzen

mit einem sauren Puffer ausgeschüttelt. Andererseits werden wässrig - alkoholische Extrakte mit apolaren, lipophilen Lösungsmitteln extrahiert.

Da der bei der Azetonextraktion der Blutprobe anfallende Rückstand viele Fette und Lipide enthält, erschien es vorteilhaft, eine wässrig - alkoholische Lösung des Rückstandes mit Hexan oder Pentan zu extrahieren. Bei einer Überprüfung der Verteilung der Neutralstoffe und der sauren Substanzen in diesen Phasen stellte es sich heraus, daß die meisten Arzneistoffe quantitativ in der wässrigen Phase verblieben. Nur Methaqualon ging bei Anwendung von Hexan, Heptan oder Pentan bis zu 50% in die organische Phase über und war auch nicht durch mehrmaliges Schütteln mit der wässrigen Phase reextrahierbar. Bei der Überprüfung der Reinigungswirkung in der vorher beschriebenen Weise durch Dünnschichtchromatographie zeigte es sich, daß die Reinigungswirkung dieser Verteilung sehr gering war.

In Abänderung des beschriebenen Verfahrens wurde nun als apolares Lösungsmittel Tetrachlormethan gewählt. Bei der Verteilung zwischen den Phasen Äthanol - Wasser - Tetrachlormethan konnte auch keine bessere Reinigungswirkung festgestellt werden. Der in der lipophilen Phase gelöste Anteil des Arzneistoffs Methaqualon war auch immerhin noch erheblich (20%), so daß eine Anwendung der vorgeschlagenen Verteilungsverfahren im Hinblick auf ihre geringe Reinigungswirkung sicherlich nicht zum vollen Erfolg führt.

Wenn für das nach eigenem Vorschlag modifizierte Verfahren von SUNSHINE und GERBER (36) dennoch Pufferlösungen eingesetzt werden, so erfolgte dies zur Gruppentrennung von Arzneistoffen und zur Entfernung bestimmter Verunreinigungen. Das wird an gegebener Stelle erläutert werden.

7. Die Modifikation des Verfahrens von SUNSHINE und GERBER

I. Vor- und Nachteile des Verfahrens

Im Abschnitt A 3 I ist schon kurz auf das im Atlas der UV- und IR-Spektren von SUNSHINE und GERBER (36) beschriebene Verfahren zur Abtrennung und zum Nachweis von Arzneistoffen im Blut und biologischen Flüssigkeiten eingegangen worden. Es werden je nach Anforderungen an die Reinheit zwei verschiedene Methoden zum Nachweis durch UV- und IR-Spektrophotometrie beschrieben. Da die IR-Spektren einen hohen Reinheitsgrad der aus biologischem Material isolierten Arzneistoffe erfordern, erschien diese Methode als Isolierungsverfahren für eine Identifizierung mittels Dünnschichtchromatographie besonders geeignet zu sein.

Zur Beurteilung der Methode und ihrer Eignung und Anwendbarkeit für die Dünnschichtchromatographie wurden zahlreiche Untersuchungen unter genauester Beobachtung der Originalvorschrift durchgeführt und die isolierten Substanzen dünnschichtchromatographisch geprüft. Das Verfahren mußte selbstverständlich auch auf die Untersuchung arzneistofffreier Blutproben angewendet werden, um etwaige Störungen durch Verunreinigungen zu erkennen. Es war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit nur die Extraktion von sauren und neutralen Arzneistoffen aus dem Blut zu studieren.

Auf Grund der bei der Nacharbeitung gewonnenen Erfahrungen sollen kurz zusammengefaßt zuerst die Vor- und Nachteile der Originalmethode beschrieben werden und danach systematisch die Möglichkeiten zur Beseitigung der festgestellten Mängel diskutiert werden.

Es sei darauf hingewiesen, daß die eigenen Modifikationen des Verfahrens ganz speziell auf die Anwendbarkeit des Verfahrens für die Dünnschichtchromatographie zugeschnitten sind und keineswegs den Wert der Originalmethode für die IR-Spektroskopie schmälern sollen.

Die Vorteile des Verfahrens nach SUNSHINE und GERBER (36) gegenüber den bisherigen Methoden sind folgende:

1. Das Verfahren stellt eine allgemein anwendbare Schnellmethode zum Nachweis aller Gruppen von Arzneistoffen mittels IR-Spektrophotometrie dar.
2. Der von den Autoren vorgeschlagene Reinigungs- und Trennungsgang erweist sich als sehr wirksam.
3. Die am Beginn des Verfahrens entgegen dem klassischen STAS - OTTO - Gang (27, 28) stehende Extraktion ist bezüglich der Trennung von sauren und neutralen Arzneistoffen von Vorteil. (Vgl. auch VIDIC: "Die Anwendung der multiplikativen Verteilung ..." (52))
4. Gleichzeitig erfolgt bei der alkalischen Anfangsextraktion im Gegensatz zu der sauren Extraktion eine andersartige Denaturierung der Eiweißstoffe. Dadurch erhält man in den Extrakten eine geringere und leichter entfernbare Menge von Verunreinigungen.

Auf die Nachteile des Verfahrens soll etwas ausführlicher eingegangen werden:

(Anfangsextraktion)

- a) Die Autoren des Verfahrens schlagen eine direkte Ausschüttelung des Blutes mit Chloroform vor. Nach den im Abschnitt A 3 I getroffenen Feststellungen bedeutet das Bildung von Emulsionen und Konglomeraten und damit eine mangelhafte Ausschüttelung und Ausbeute.
- b) Die direkte Extraktion des Blutes mit Chloroform bewirkt eine starke Mitextraktion von Fetten und Lipiden. Es sollte von vornherein vermieden werden, mit stark lipophilen Lösungsmitteln zu extrahieren, um den Anteil der fettigen Rückstände nicht unnötig zu vergrößern.
- c) Die Ausfällung der Eiweißstoffe und der Lipide geschieht in alkalischer Lösung und durch Zusatz von

wenig gealtertem Zinkhydroxid. Die alkalische Lösung kann schon bei relativ kurzer Einwirkungsdauer eine Veränderung der Arzneistoffe hervorrufen. So werden z.B. Bromharnstoffderivate zu Hydantoinen umgewandelt (VIDIC (72)), beim Glutethimid tritt eine Ringspaltung ein (GOLDBAUM und WILLIAMS (101)) und auch manche Barbiturate werden bei längerer Einwirkungsdauer verändert.

Das aktive Zinkhydroxid - Gel besitzt sicher genügend Adsorptionskraft, um auch Arzneistoffe fest zu binden, wodurch bei manchen Arzneistoffen erhebliche Ausbeuteverluste bedingt sein können.

(Isolierung der sauren Substanzen)

- d) Das Blutkoagulat wird durch die Säurezugabe beim Homogenisieren nur unvollständig wieder aufgelöst. Die eingeschlossenen Arzneistoffe werden dadurch nur zum Teil wieder extrahierbar. Nach dem Homogenisieren kann sich beim Ausschütteln wieder eine Emulsion bilden.
- e) Zur Entfernung der feinen ungelösten Teilchen wird eine Filtration durch ein bakteriendichtes Filter vorgeschrieben. Dies ist zwar eine sehr wirkungsvolle Reinigung, aber die in der Lösung vorhandenen Sinkstoffe verstopfen sehr schnell die Poren des feinen Filters und bedingen dadurch eine sehr langsame Filtrationsgeschwindigkeit. Die Filtrationsdauer kann bei größerer Verunreinigung bis zu 45 Minuten betragen.

(Isolierung der Neutralstoffe)

- f) Die Anwendung alkalischer Lösungen mit einem pH-Wert von 11 kann trotz der vorgeschriebenen niedrigen Temperatur zu einer Veränderung von Arzneistoffen führen. Außerdem ist die restlose Suspension und Ablösung der fettigen Bestandteile von der Schälchenwand mit einer wässrig - alkalischen Lösung sehr schwierig.
- g) Schwierig ist ebenfalls die genaue Einstellung von zwei

pH-Werten. Für die Filtration gilt das unter e Gesagte.

- h) Bei der Ausschüttelung der Neutralstoffe aus einer wässrigen Lösung mit einem pH-Wert 7,5 ist die Ausbeute oft recht unbefriedigend. Bessere Ausbeuten ergeben sich, wenn die Chlorophormphase zur Reinigung nur noch mit sauren oder alkalischen Lösungen ausgeschüttelt wird.
- i) Beim Eintrocknen an der Luft sollte möglichst ein scharfer Luftstrom vermieden werden.

(Bestimmung der Substanzen)

- j) Das Verfahren wird von den Autoren selbst als **h a l b q u a n t i t a t i v** bezeichnet. Bezüglich der **A u s b e u t e n** an sauren Arzneistoffen konnten die angegebenen Rückgewinnungsraten **n i c h t e r r e i c h t** werden. Bei einer Überprüfung des Verhaltens der **N e u t r a l s t o f f e** erweist sich das Verfahren als vollkommen ungenügend, die **w i e d e r g e f u n d e n e n M e n g e n** von zugesetzten Arzneistoffen **s i n d s e h r g e r i n g** und manche konnten überhaupt nicht mehr nachgewiesen werden.
- k) Sind in der Blutprobe **z w e i o d e r m e h r S u b s t a n z e n** einer analytischen Gruppe enthalten, so ist eine **I d e n t i f i z i e r u n g** durch **I R - S p e k t r o s k o p i e** **k a u m m ö g l i c h**. Gerade in den Bluten von Verkehrsteilnehmern sind aber häufig mehrere Neutralstoffe nachzuweisen.

- 1) Die Reinigungswirkung ist nach dem vorgeschlagenen Verfahren für neutrale Substanzen bei deren Übertragung auf die Dünnschicht als unzureichend zu bezeichnen. Gerade in der Mitte der Laufstrecke der Dünnschicht - Platte treten Verunreinigungen auf, die die Unterscheidung der an gleicher Stelle liegenden Arzneistoffe sehr erschweren.

II. Besprechung der eigenen Verbesserungen des Verfahrens

Für die Blutextraktion ist schon vorher eine Modifikation des Verfahrens beschrieben worden, wobei durch die Verreibung mit Kieselgur und anschließender Extraktion mit Azeton die Schwierigkeiten des Extraktionsverfahrens von SUNSHINE und GERBER (36) vermieden werden.

Interessant ist, daß die Autoren von der guten Reinigungswirkung der Aktivkohle für biologische Extrakte keinen Gebrauch machen. Eine Überprüfung in eigenen Versuchen hat ergeben, daß selbst bei Anwendung von großen Mengen Kohle und lipophilen Lösungsmitteln (1 g Kohle + 50 ml Chloroform + 50 µg Arzneistoff) weder eine nennenswerte Adsorption der sauren noch der neutralen Arzneistoffe eintritt. Der für das eigene Verfahren gewählte Kohlezusatz von 0,1 g war daher als vollkommen unbedenklich anzusehen.

Mit den Trocknungsmitteln für die organischen Lösungsmittel sollte jedoch außerordentlich vorsichtig verfahren werden. Wie schon im Abschnitt A 3 III ausgeführt, kann es sehr leicht zu Einschlüssen und Adsorptionen an die getrockneten anorganischen Salze, und damit zu Ausbeuteverlusten, kommen. An den Stellen des Reinigungs- und Trennungsganges, an denen eine Trocknung der organischen Phase notwendig war, ist eine Filtration durch ein trocknes Faltenfilter eingeschaltet worden. Dieses wird dann nochmals mit etwas Lösungsmittel nachgespült. Es hat sich gezeigt, daß diese Art der Trocknung vollkommen ausreichend ist.

Besondere Beachtung muß bei dem Verfahren von SUNSHINE und GERBER (36) die Ausfällung von Proteinen und Lipiden finden. Sie wird dort in alkalischer Lösung durch Zugabe eines kurz gealterten Zinkhydroxid - Gels vorgenommen. Um Zersetzungen alkaliempfindlicher Arzneistoffe zu vermeiden, war es zweckmäßig, die zur Alkalisierung der Lösung verwendete Natronlauge durch eine Pufferlösung mit einem pH-Wert von weniger als 11 zu ersetzen. Außerdem erschien es sinnvoll, das Zinkhydroxid durch einen ähnlichen Schwermetallhydroxidniederschlag zu ersetzen, der ebenfalls eine ausreichende Entfernung der Proteine und Lipide gewährleistet, dabei jedoch den Arzneistoffen gegenüber nicht so starke Adsorptionskräfte entwickelt.

In der Literatur wird von FUJITA und IWATAKE (81) ein weiteres Verfahren angegeben, bei dem durch eine Kadmiumhydroxid - Suspension in alkalischer Lösung die Fällung von Proteinen und Eiweißen vorgenommen wird. Es werden dabei aber auch noch andere Substanzen wie Harnsäure, Kreatinin und vor allem Glutathion ausgefällt. Bei einer Überprüfung durch eigene Versuche stellte es sich heraus, daß keine bessere Reinigungswirkung gegenüber einer Fällung mit Zinkhydroxid zu erzielen war. Bezüglich der Adsorptionskraft verhielt sich das Kadmiumhydroxid ähnlich wie das Zinkhydroxid.

Häufig werden für die Ausfällung von Eiweißstoffen z.B. im Harn Bleisalze in fester Form oder als konzentrierte Lösungen zugesetzt. In alkalischer Lösung tritt dann eine Ausflockung von Blei-II-hydroxid ein. In konzentrierten Alkalilaugen ist dieses dann wieder etwas (als Plumbit) löslich. Um einerseits eine Bildung von Plumbiten zu vermeiden und andererseits die Veränderung von Arzneistoffen durch zu starke alkalische Lösungen zu verhindern, war es angezeigt, die Fällung in einer Pufferlösung zu erzeugen. Als Pufferlösung wurde die von VIDIC (52) vorgeschlagene Phosphatpufferlösung von pH 10,7 verwendet. Bei diesem pH-Wert bleiben die Barbiturate noch als Salze in der

wässrigen Phase gelöst und die Neutralstoffe lassen sich gut durch Ausschütteln abtrennen. Die Alkalität der Pufferlösung ist aber auch nicht so groß, daß befürchtet werden muß, daß innerhalb der Einwirkungszeiten des Alkalis eine nennenswerte Zersetzung von Neutralstoffen eintritt. Bei Versuchen, bei denen Glutethimid und ein Bromharnstoffderivat 1 Stunde lang in der alkalischen Lösung verblieben, wurde festgestellt, daß nur ca. 20% der Arzneistoffe verändert waren. Für die Schüttelzeit von maximal 10 Minuten ist daher nur eine relativ unbedeutende Veränderung anzunehmen.

Eine Überprüfung der adsorptiven Wirkung der Bleihydroxid - Suspension ergab, daß keiner der untersuchten Arzneistoffe in nennenswerter Weise adsorbiert wurde. Dabei wurde so vorgegangen, daß zu 10 ml Pufferlösung pH 10,7 1 ml gesättigte Bleinitratlösung (in Wasser) tropfenweise zugesetzt, und nach Zugabe von 50 µg Arzneistoff und Chloroform ausgeschüttelt wurde. In dem Chloroformextrakt wurde dann die Menge Arzneistoff dünnenschichtchromatographisch halbquantitativ festgestellt. Nur für Carbromal ergaben sich sehr schlechte Ausbeuten. Es konnte nachgewiesen werden, daß hier nicht etwa eine Adsorption an den Hydroxid - Niederschlag stattgefunden hatte, sondern daß allein schon die Ausschüttelung von Carbromal aus alkalischer Lösung sehr schlechte Ausbeuten ergibt. Außerdem wird Carbromal in alkalischer Lösung sehr schnell verändert. In Hinblick auf die guten Ausbeuten an anderen Arzneistoffen, insbesondere auch von Bromisoval, mußte für diese Substanz eine schlechte Ausbeute in Kauf genommen werden.

Die Ausschüttelung der Bleihydroxid - Suspension gelingt nunmehr ohne große Schwierigkeiten. Da der Hauptanteil der Proteine, Lipide und anderer Verunreinigungen schon durch die Blutextraktion mit Azeton ausgeschieden wird, ist die Bildung einer Emulsion nicht mehr möglich. Eine schwache Trübung der Chloroformphase konnte durch Filtration entfernt werden. Auch diese Trübung kann durch die

später noch zu beschreibende saure Hydrolyse verhindert werden.

Um gute Ausbeuten an Arzneistoff zu erhalten, empfiehlt es sich, die Suspension zwei- oder dreimal auszuschütteln. Die Chloroformauszüge werden dann in einem mäßigen Luftstrom auf etwa 10 ml eingedampft. Dieser Extrakt dient zur Gewinnung der Neutralstoffe.

Die Reinigung durch die Extraktion mit Azeton und die anschließende Fällung mit Bleihydroxid ist aber noch nicht ausreichend. Bei einer Überprüfung von 20 Blutproben von Verkehrsteilnehmern, von denen nach den Unterlagen bekannt war, daß sie in den letzten 24 Stunden vor der Blutentnahme keine Arzneimittel genommen hatten, wurde das Blut in der beschriebenen Weise aufgearbeitet und die wässrig - alkalische Phase (saure Arzneistoffe) sowie die Chloroformphase (neutrale Arzneistoffe) auf Verunreinigungen untersucht. Bei den sauren Substanzen wurden dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel in dem System Chloroform : Azeton 9 : 1 die mit Quecksilber-I-nitrat positiv reagierenden Verunreinigungen festgestellt. Geringe Braunfärbungen deuteten auf kleine Verunreinigungen hin.

Diese schwachen Verunreinigungen konnten, nach SUNSHINE und GERBER (36), durch Zugabe einer 10%igen Zinksulfatlösung zu der angesäuerten alkalischen Phase der Suspensionsausschüttelung gut beseitigt werden.

Die noch in der Chloroformphase befindlichen Verunreinigungen wurden ebenfalls dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgelschichten in dem System Chloroform - Azeton - NH_3 25%ig 100 : 5 : 10 nachgewiesen. Es zeigte sich, daß recht erhebliche Mengen störender Verunreinigungen positiv mit dem α -Naphthoflavin-Reagens reagierten.

Im Hinblick auf das angewandte Extraktionsverfahren kommen als Verunreinigungen gut wasserlösliche Substanzen aus dem Blute in Frage. Es könnte sich dabei um saure Amino-

säuren oder bestimmte Lipidfraktionen handeln. Kohlenhydrate waren dabei wegen des geringen Vorkommens im Blut und Fette (Neutralfette) wegen der stark polaren Extraktion von vornherein als maßgebliche Verunreinigungen auszuschließen.

Zum Nachweis der Aminosäuren, der Peptide und Proteine im Rückstand der Chloroformphase wurde wieder die Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Als Trägerschicht wurde Zellolose MN 300 und als Fließmittel n-Butanol - Eisessig - Wasser 60 : 20 : 20 eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit Ninhydrin in der Modifikation für die Dünnschichtchromatographie und anschließend nach Chlorierung durch Besprühen mit dem α -Naphthoflavonreagens.

Verunreinigungen, die zu der Gruppe der Eiweiße und ihrer Abbauprodukte gehören, müssen dabei einerseits eine Anfärbung mit Ninhydrin und an der gleichen Stelle mit dem α -Naphthoflavonreagens zeigen. Es konnten jedoch keine ninhydrinpositiven Flecken festgestellt werden. Das andere Reagens zeigte jedoch eine intensive Anfärbung mehrerer Flecken, die über die Laufstrecke verteilt waren. Daher war zu vermuten, daß die Verunreinigungen einer anderen Gruppe von Verbindungen angehörten. Als weitere Gruppe, der die störenden Stoffe angehören könnten, kamen stark polare Lipide, also z.B. Phospholipide, in Betracht. Von WAGNER, HÖRHAMMER und WOLFF (102) wird für diese Stoffe als Dünnschicht - System die Chromatographie auf Kieselgelschichten mit dem Fließmittelsystem Chloroform - Methanol - Wasser 65 : 25 : 4 vorgeschlagen. Als Nachweisreagenzien fanden alkoholische Rhodaminlösung und das Ammonmolybdat - Perchlorsäure - Reagens (nach STAHL (8) R 129 und nach HAIŠ und MACEK (10) D 45a) Verwendung. An den Stellen der stärksten Verunreinigungen, die zunächst durch starke Fluoreszenz im kurzwelligen UV (254 nm) lokalisiert wurden, wurde durch das Ammonmolybdat - Perchlorsäure - Reagens eine stark blau-violette Anfärbung erzielt. Es konnte also angenommen werden, daß

der Hauptanteil der störenden Verunreinigungen aus bestimmten Phospholipiden besteht. Nach der Lage der Rf-Werte muß es sich dabei um aliphatische Lipide handeln.

Nachdem die Art der Verunreinigung ermittelt worden war, lag es nahe, die Fällung der Phospholipide mit Molybdänsäure zu versuchen. Durch Versuche konnte nun festgestellt werden, daß sich hierfür das von HAIŠ und MACEK (10) vorgeschlagene Ammoniummolybdat - Salpetersäure - Reagens (D 45c) sehr gut eignet. Schon der Zusatz von wenigen Tropfen dieses Reagenzes zu dem in einer Azeton - Wasser - Mischung aufgenommenen Rückstand des Azetonextraktes bewirkte, allerdings nach einer etwas längeren Zeit und schwacher Erwärmung, die Ausfällung der störenden Verbindungen. Eine weitere interessante Nebenerscheinung dieser Ausfällung war es, daß andere, nicht mit dem α -Naphthoflavonreagens positiv reagierende, aber dennoch störende Verbindungen, ebenfalls zum Teil entfernt wurden. Es handelt sich offenbar um den Vorgang einer schwach sauren Hydrolyse (pH-Wert der Analysenlösung nach Zusatz des Reagenzes ca. 4).

In den Analysengang wurde also nunmehr die Fällung und Hydrolyse mit dem Ammoniummolybdat - Salpetersäure - Reagens eingeschaltet. Versuche mit Arzneistoffen haben gezeigt, daß bei der Einwirkung dieses Reagenzes und der schwach sauren Hydrolyse keine Veränderung der Arzneistoffe der beiden zu untersuchenden Gruppen zu befürchten ist.

Die Fällung mit Molybdänsäure bewirkte auch bei der nachfolgenden Bleihydroxid - Fällung und Ausschüttelung mit Chloroform eine bessere Abtrennung der Phasen; die Chlorophormphase wies auch weitaus weniger Trübungen auf als vorher.

Zum Nachweis der Neutralstoffe genügte es nunmehr, die nach der Ausschüttelung der Bleihydroxid - Suspension gewonnenen, vereinigten und auf ein Volumen von 10 ml eingedampften Chloroformextrakte mit einer 10%igen Phosphorsäu-

relösung auszuschütteln. Diese saure Ausschüttelung erwies sich als notwendig zur Abscheidung eventuell mitextrahierter basischer Substanzen, die nicht untersucht werden sollten und zur Entfernung anderer basischer Verunreinigungen. Der so gewonnene Chloroformextrakt wurde unter Nachspülen durch ein Faltenfilter filtriert und im schwachen Luftstrom eingedampft.

Nach eingehenden Untersuchungen muß gefordert werden, daß die die Neutralstoffe enthaltenden Phasen nur bei Normaltemperatur und nicht etwa auf dem Wasserbad eingedampft werden. Bei Substanzen wie Methypylon und Pyrithyldion kann es bei Anwendung höherer Temperatur und einem starken Luftstrom zu ganz erheblichen Verlusten kommen. Wird bei Normaltemperatur ein zu starker Luftstrom verwendet, so kommt es infolge von Abkühlung zu einer Wasserkondensation. Die Entfernung größerer Wassermengen durch Luftverdampfung erfordert wieder einen größeren Zeitaufwand und führt zu einer unnötigen Verlängerung der Analysenzeit.

Trotzdem empfiehlt es sich, um ein zu starkes Hochwandern der Substanzen an den Schälchenwänden zu verhindern und um Verdampfungsverluste vollkommen auszuschließen, der Chloroformlösung einen Tropfen Wasser hinzuzugeben.

Der Wert des nach eigenen Versuchen entwickelten Verfahrens ist am besten ablesbar an den Ausbeuteraten. Es muß darauf hingewiesen werden, daß dieses Verfahren auch nur als halbquantitativ bezeichnet werden kann, jedoch zur Beurteilung der geforderten Fragestellung, wie später noch dargestellt werden soll, als vollkommen ausreichend erachtet wird. Wenn auch bei einigen Arzneistoffen die Ausbeuteergebnisse als schlecht zu bezeichnen sind, liegt das im wesentlichen daran, daß bei der Extraktion von Arzneistoffen von verschiedenartigstem Charakter ein allgemeines Verfahren immer einen Kompromiß darstellt. Bei der Entwicklung eines Verfahrens zum Nachweis eines einzelnen Arzneistoffs gelingt es meistens, bessere Ausbeuteergeb-

nisse zu erzielen.

Ganz besonderer Wert wurde bei der Ausarbeitung des Verfahrens darauf gelegt, alle toxikologisch in der Verkehrsmedizin interessanten Arzneistoffe - soweit sie der sauren und neutralen Gruppe angehören - nachzuweisen. Auch bei der Entwicklung der Dünnschicht - Systeme wurde davon ausgegangen, einen sicheren Nachweis für die bestimmten Substanzen zu führen.

Es wurde weiterhin berücksichtigt, daß bei der ständigen Zunahme von Arzneistoffen im Handel bald verkehrsmedizinisch wichtige Substanzen auftauchen werden, deren Nachweis durch dieses Untersuchungsverfahren möglich sein muß. Es ist jedoch zu empfehlen, vor dem Nachweis dieser neuen Arzneistoffe zunächst einige Modellversuche durchzuführen.

Die Ausbeuten an Arzneistoffen bei diesem Verfahren sind durch Modellversuche gewonnen worden. Einer Blutprobe von 5 ml wurden 50 µg Arzneistoff hinzugegeben (entsprechend einem Gehalt von 1 mg %) und nach dem im nächsten Kapitel genau aufgeführten Verfahren extrahiert. Sodann wurde dünnschichtchromatographisch halbquantitativ die Ausbeute bestimmt. In der Gruppe der sauren Arzneistoffe wurden nur die Ausbeuten von einigen Substanzen bestimmt, da auf Grund der Verteilungskoeffizienten ohne weiteres Schlüsse über die Ausbeuten ähnlicher Verbindungen möglich sind.

Tabelle 16

Ausbeuten an Arzneistoffen nach dem modifizierten SUNSHINE
 - GERBER - Verfahren bei Zusatz von 50 µg pro 5 ml Blut
 (1,0 mg ‰)

Arzneistoff	Ausbeute an Arzneistoff	
Carbromal	25 ‰	
Acetylcarbromal	60 ‰	
Bromisoval	60 ‰	
Nocturetten	60 ‰	
Methyprylon	85 ‰	
Pyrithyldion	85 ‰	
Glutethimid	75 ‰	
Ethinamat	60 ‰	
Meprobamat	70 ‰	
Methylparafynol	70 ‰	
Methaqualon	90 ‰	
Phenacetin	85 ‰	
Phenazon	70 ‰	
Barbital	86 ‰	} UV-Spektrophotometrisch bestimmt
Phenobarbital	90 ‰	
Pentobarbital	83 ‰	
Cyclobarbital	86 ‰	
Hexobarbital	75 ‰	

Der Zeitbedarf des neu entwickelten Verfahrens ist ebenso wie der des SUNSHINE - GERBER - Verfahrens nicht gering. Für die Durchführung einer Analyse mit Nachweis von sauren und neutralen Arzneistoffen ist ein Zeitbedarf von 8 - 10 Stunden zu veranschlagen. Das ist zwar mehr als die meisten Schnellverfahren beanspruchen, aber es wird bei diesen ja auch meist nur der Gruppennachweis der Arzneistoffe gefordert, weil es bei Vergiftungsfällen hauptsächlich auf die anzuwendende Therapie ankommt. Der Zeitbedarf des vorliegenden Verfahrens ist ohne weiteres vertretbar im Hinblick auf die weitreichenden Folgen des Analysenergebnisses. Bei der Untersuchung der Blutproben von Verkehrsteilnehmern sollen die Arzneistoffe nicht nur genau identifiziert, sondern auch möglichst genau quantitativ bestimmt werden.

III. Allgemeine Betrachtungen zum Analysenverfahren

Wie schon im einzelnen begründet wurde, mußte bei der Entwicklung des Untersuchungsganges besonderer Wert auf eine sehr gute Reinigung der Arzneistoffe gelegt werden. Da die Blutproben in ihrer Zusammensetzung auch in Bezug auf die störenden Anteile sehr unterschiedlich sein können, sind große Schwierigkeiten bei der Isolierung der Arzneistoffe zu überwinden. Für die sauren Arzneistoffe ist eine Reinigung insofern nicht so schwierig, weil sie abwechselnd aus saurer Lösung mit organischen Lösungsmitteln und aus diesen mit wässrigen alkalischen Lösungen wieder ausgeschüttelt werden können. Bei den Neutralstoffen ist ein derartiges Verfahren nicht möglich.

Überdies sind die Blutproben manchmal außerordentlich fett- und lipidreich und die Abscheidung dieser Substanzen gelingt dann unvollständig. Bei dem vorliegenden Verfahren sind diese Störungen durch Verwendung von polaren Lösungsmitteln und einer Azeton - Wasserfraktionierung mit anschließender Ausfällung störender Stoffe und Hydrolyse ausgeschaltet worden.

Die Substanzen, insbesondere die Neutralstoffe, lassen sich sehr häufig (wahrscheinlich durch die Mitwirkung organischer Lösungsvermittler) auch nur unzureichend aus der wässrigen Lösung ausschütteln. Deshalb ist das umgekehrte Verfahren angewendet worden.

Bisher ist der Isolierung der Neutralstoffe aus dem Blut in der Literatur noch wenig Beachtung geschenkt worden. Offenbar hängt das mit den großen Schwierigkeiten beim Nachweis zusammen. Es ist nicht leicht, den Nachweis für alle Vertreter dieser Klasse von Arzneistoffen in einem Arbeitsgang zu führen, weil bisher die Detektion nur durch Anwendung relativ unspezifischer Reagenzien gelungen ist. Bei der großen Empfindlichkeit der Anzeige der Arzneistoffe sowie gleichermaßen auch der Störsubstanzen gegenüber den verwendeten Reagenzien ist das durchaus verständlich. Gerade diesem Problem der Reinigung der Extrakte aus Blutproben ist bisher noch nicht genügend Aufmerksamkeit gewidmet worden. Es kann sogar vorkommen, daß bestimmte Verunreinigungen Arzneistoffe vortäuschen, weil sie ein ähnliches chromatographisches Verhalten wie die Arzneistoffe zeigen. Deshalb ist bei den Versuchen großer Wert auf die Ausschaltung dieser Störungen gelegt worden. Um zu beweisen, daß diese Störungen vollständig beseitigt worden sind, sind sehr viele verschiedene Blutproben (von Verkehrsteilnehmern, aus Versuchsreihen des gerichtsmedizinischen Instituts der FU Berlin, von Leichen und aus Blutkonserven) überprüft worden. Es wurden sicher arzneistofffreie Blutproben verwendet, denen in bestimmten Versuchsreihen Arzneistoffe zugesetzt wurden. Eine Abbildung (Abb. 7) soll bei einer Gegenüberstellung der beiden Verfahren zeigen, inwieweit die Verunreinigungen entfernt worden sind.

Das neu entwickelte Verfahren ist auch schon bei der Begutachtung von Verkehrsstrafsachen mit Erfolg eingesetzt worden.

8. Arbeitsvorschrift für das neue Verfahren zur Isolierung der sauren und neutralen Arzneistoffe aus Blutproben

Prinzip:

Das Vollblut wird nach dem Verreiben mit Kieselgur und Ansäuern mit Azeton extrahiert und so von der Hauptmenge der Ballaststoffe befreit. Die Fällung durch Ammoniummolybdat - Salpetersäure in wässriger Lösung und die saure Hydrolyse bewirken eine Abtrennung von störenden Verunreinigungen, insbesondere von Phospholipiden. Eine weitere Reinigung wird durch eine Bleihydroxidfällung im gepufferten alkalischen Milieu erzielt. Durch die Ausschüttelung dieser Suspension mit Chloroform gelingt es, die neutralen Arzneistoffe in die organische Phase zu überführen, während die sauren Substanzen als Na-Salze in der wässrigen Phase verbleiben. Die Chloroformphase wird nochmals gereinigt und der Eindampfungsrückstand in 3 Dünnschicht - Systemen chromatographiert. Die wässrige Suspension wird nach dem Ansäuern mit Chloroform extrahiert und der Verdampfungsrückstand der Dünnschichtchromatographie in zwei Systemen unterworfen. Zur weiteren Differenzierung dient eine H_2SO_4 - Behandlung auf der Dünnschicht mit anschließender Chromatographie.

Chemikalien und Reagenzien:

Kieselgur "Merck", säuregewaschen und geglüht, nachbehandelt durch sechsstündige Extraktion mit Azeton in der Soxhlet - Apparatur.

Azeton chemisch rein, DAB 6, einmal destilliert über Natriumhydroxid in Rotuliform.

Chloroform handelsüblich, DAB 6, dreimal natronalkalisch und dreimal sauer gewaschen, mit Natriumsulfat sicc. getrocknet und destilliert.

Natriumbisulfat, 10%ige Lösung von $\text{NaHSO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ in dest. Wasser.

Molybdänsäurelösung 5 g Ammoniummolybdat $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} + 4\text{H}_2\text{O}$ werden in 100 ml dest. Wasser gelöst und 30 ml konzentrierte Salpetersäure hinzugegeben.

Bleinitratlösung, gesättigte Lösung von Bleinitrat $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ in dest. Wasser, 6 Stunden mit Chloroform perforiert.

Phosphatpuffer pH 10,7, hergestellt durch Auflösen von 2 Vol. Teilen Trikaliumphosphat p.a. $(\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$ - 0,8 molar

1 Vol. Teil Natriumnitrat neutral, Dihydrat - 1,0 molar gegen Indikator durch Zusatz von 25% Phosphorsäure pH 10,7 eingestellt.

6 Stunden mit Chloroform perforiert, pH-Wert mit dem pH-Meter überprüft und nochmals eingestellt.

Ortho-Phosphorsäure, konzentriert, analysenrein. $d = 1.71$

Phosphorsäurelösung, 10%ige Lösung von Phosphorsäure in dest. Wasser.

Zinksulfatlösung, 10%ige Lösung von $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in dest. Wasser.

0,5 n-Natronlauge.

Kieselgel G nach STAHL (8) zur Dünnschichtchromatographie.

Geräte:

Desaga - Ausrüstung zur Dünnschichtchromatographie

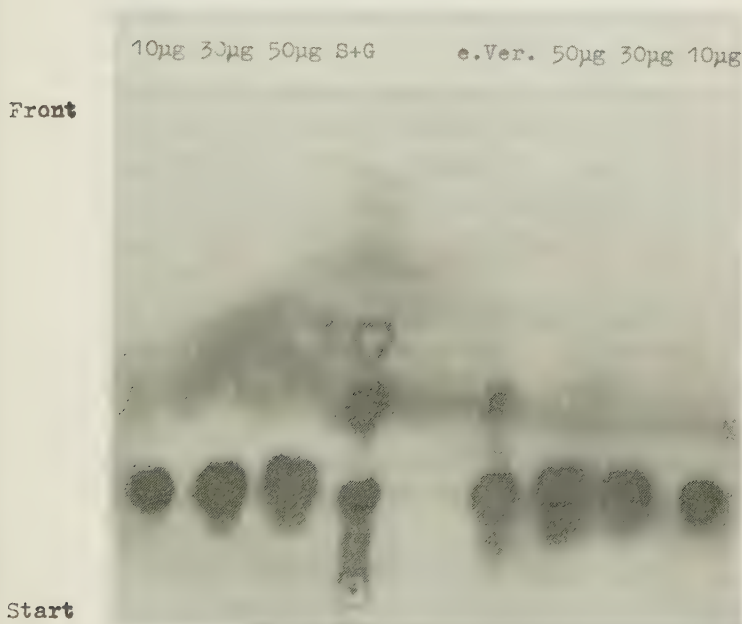
Magnetrührer

Homogenisator, hochtourig

Vakuumrotationsverdampfer

Abb. 7

Gegenüberstellung der chromatographischen Auftrennung von Extraktionsrückständen aus Blutproben, die nach verschiedenen Verfahren gewonnen wurden, auf einer Dünnschichtplatte. Kieselgel G, Syst.II(Neutralstoffe), Detektion: α -Naphthoflavin.



Modellversuch: Extraktion von 50 µg Bromisoval aus 5 ml Blut.

S + G: Extraktion nach der Vorschrift von SUNSHINE und GERBER.

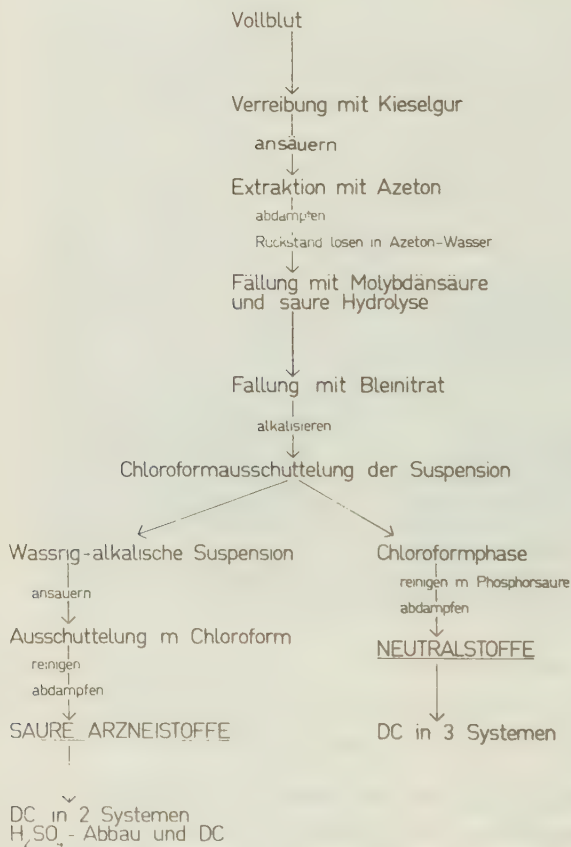
e.Ver: Extraktion nach dem eigenen Verfahren

(Anmerkung: Nach dem Ansprühen mit dem Detektionsreagens erscheinen die Arzneistoffflecken und die Verunreinigungen beim S + G-Verfahren blauviolett angefärbt, während der schwache Fleck oberhalb des Substanzflecks beim eigenen Verfahren nur schwach bräunlich gefärbt ist.)

Zum Vergleich sind noch verschiedene Mengen von reinem Bromisoval mit aufgetragen worden.

Abb. 8

Schema des neuen Reinigungs- und Trennungsganges zur Isolierung und zum Nachweis der sauren und neutralen Arzneistoffe aus Blutproben



Arbeitsanleitung:A. Blutextraktion

1. 5 ml Vollblut werden mit 4 g Kieselgur in einem Porzellanmörser gut verrieben.
2. Zu der Mischung wird tropfenweise 1 ml 10%ige Natriumbisulfatlösung hinzugegeben und nochmals verrieben.
3. Die Mischung wird in einen Erlenmeyerkolben überführt, in dem sich bereits 50 ml Azeton befinden.
4. Diese Mischung wird 1 Minute lang homogenisiert. (Homogenisator).
5. Es werden nochmals 50 ml Azeton hinzugefügt und das Homogenisat 15 Minuten lang mechanisch gerührt. (Magnetrührer).
6. Die festen Bestandteile werden absitzen gelassen. Das Azeton wird durch ein Blauband - Faltenfilter 9 cm Ø hart filtriert.
7. Zu dem Rückstand werden nochmals 50 ml Azeton hinzugegeben und 5 Minuten lang mechanisch gerührt. Nach der Filtration werden beide Auszüge vereinigt.

B. Reinigung des Azetonauszuges

8. Der Azetonauszug wird im Vakuumrotationsverdampfer bei 40° C und ca. 10 mm Hg bis fast zur Trockene eingedampft.
9. Der Rückstand wird mit 5 ml Azeton und zweimal 10 ml dest. Wasser in ein Abdampfschälchen überführt. Es werden 8 - 10 Tropfen Molybdänsäurelösung hinzugegeben und die Lösung mit pH-Papier auf saure Reaktion geprüft.
10. Sodann wird die wässrige Flüssigkeit ungefähr 20 Minuten bei 90° C erhitzt (Rand eines Wasserbads).
11. Die Flüssigkeit wird sodann in einen Eisschrank gestellt

und nach dem Abkühlen auf ca. 5°C durch ein Faltenfilter 9 cm $\varnothing$ hart in einen Scheidetrichter filtriert.

C. Auftrennung der Arzneistoffgruppen

12. Die Lösung wird mit 1 ml gesättigter Bleinitratlösung versetzt und kurz geschüttelt. Dann werden 10 ml Pufferlösung pH 10,7 zugesetzt und etwa 3 Minuten geschüttelt.

13. Die Suspension wird zweimal mit je 35 ml Chloroform jeweils 5 Minuten ausgeschüttelt.

14. Die Chloroformauszüge werden filtriert, vereinigt und bei einem schwachen Luftstrom bei normaler Temperatur auf etwa 10 ml eingedampft.

Dieser Extrakt enthält die Neutralstoffe (N).

Die Suspension enthält die sauren Arzneistoffe (S).

D. Identifizierung der Neutralstoffe

15. Der eingeengte Chloroformauszug N wird mit 10 ml 10%iger Phosphorsäure im Scheidetrichter geschüttelt, die wässrige Phase verworfen und die organische Phase nach Filtration und Nachspülen in ein Abdampfschälchen überführt.

16. Nach dem Eindunsten im Luftstrom (unter Zusatz von einem Tropfen Wasser) wird der Rückstand in 4 ml Chloroform aufgenommen und spektrophotometrisch im UV - Bereich auf Absorption geprüft. Nun wird erneut eingedampft.

17. Der Rückstand wird in wenig Äthanol - Azeton (1 + 1) aufgenommen und in 3 gleiche Teile geteilt.

18. Zunächst wird ein Teil des Rückstandes auf eine Kieselgeldünnschichtplatte aufgetragen und in dem System Chloroform - Azeton - NH_3 25%ig 100 : 5 : 10 entwickelt und die Detektion mit dem α -Naphthoflavonreagens durchgeführt. Gelingt es nicht, den Substanzfleck einem be-

stimmten Arzneistoff zuzuordnen, dann wird eine zweite Dünnschicht - Platte in dem System Tetrachlormethan - Dichlormethan - Azeton - Ameisensäure 60 : 40 : 5 : 4 entwickelt. Hier kann dann schon ein spezifisches Reagens eingesetzt werden. In Zweifelsfällen kann die Chromatographie in dem dritten System vorgenommen werden.

E. Identifizierung der sauren Arzneistoffe

19. Die Suspension (S) wird mit konzentrierter Phosphorsäure auf pH 3 angesäuert und mit 10 ml Zinksulfatlösung 10%ig versetzt und durch ein Faltenfilter 9 cm $\varnothing$ hart filtriert. Danach wird zweimal mit je 35 ml Chloroform ausgeschüttelt.
20. Die Chloroformauszüge werden filtriert und vereinigt.
21. Der Chloroformauszug wird mit 4 ml 0,5 n-Natronlauge ausgeschüttelt und im UV werden Maxima und Minima festgestellt.
22. Die alkalische Lösung wird angesäuert und zweimal mit je 35 ml Chloroform extrahiert und eingedampft.
23. Der Rückstand wird in wenig Äthanol - Azeton (1 + 1) aufgenommen und in 3 gleiche Teile geteilt.
Ein Teil des Rückstandes wird in dem System Chloroform - Isopropanol - NH_3 25%ig 75 : 25 : 10 chromatographiert. Nach dem Besprühen mit den Reagenzien Quecksilbernitrat - Diphenylcarbazon und Kaliumpermanganat ist schon eine engere Wahl unter bestimmten Substanzen möglich. Nunmehr wird der zweite Teil des Rückstandes auf eine Dünnschicht - Platte aufgetragen, mit 5 μl 0,1 n-Schwefelsäure befeuchtet und 45 Minuten lang auf 120°C erhitzt. Sollte nach der Entwicklung im System Chloroform - Azeton - NH_3 25%ig 100 : 5 : 10 keine eindeutige Zuordnung möglich sein, so wird der letzte Teil in dem Dünnschicht - System Chloroform - Azeton 9 : 1 nochmals chromatographiert.

Mögliche Schwierigkeiten des Nachweises

1. Sehr geringe Arzneistoffkonzentration im Blut.

Bei der Entwicklung des Analysenganges ist davon ausgegangen worden, daß nur über 1 mg % liegender Konzentrationen saurer und neutraler Arzneistoffe verkehrsmethodisch von Bedeutung sind. Das entspricht einer Absolutmenge von 50 µg in 5 ml Blut. Wenn sich aus den

Akten keinerlei Hinweise auf die Natur des Arzneistoffs ergeben, so kann nur oberhalb dieser Konzentration ein einigermaßen gesichertes Ergebnis der Analyse erwartet werden. Soll jedoch nur nachgewiesen werden, ob ein bestimmter Arzneistoff im Blut vorhanden ist oder nicht, so darf man im allgemeinen die Nachweisbarkeitsgrenze bei 20 µg (entsprechend einem Gehalt von 0,4 mg/%) ansetzen.

Eine Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit ist durch eine Modifikation des Verfahrens zu erreichen, indem man das Blut - Kieselgur - Azeton - Homogenisat über Nacht stehen läßt. Dabei kann häufig eine Ausbeutesteigerung um 5 - 10 % erzielt werden.

2. Der nachzuweisende Arzneistoff ist nicht in dem Analysenschema enthalten.

Wegen der großen Anzahl der therapeutisch verwendeten und der beständig neu in den Handel kommenden Arzneistoffe war es unmöglich, alle Spezialitäten in das Schema mit aufzunehmen. Es sind nur diejenigen Substanzen in ihrem Verhalten bei dem Analysenverfahren geprüft worden, die sich in den letzten Jahren als toxikologisch bedeutsam erwiesen haben. Ist ein neuer Arzneistoff nachzuweisen, so müssen zunächst Modellversuche zu dessen Einordnung in das Schema unternommen werden.

3. Der Arzneistoff kann nicht eindeutig identifiziert werden.

Sollte sich der Arzneistoff nicht in das Schema einordnen lassen, so müssen zu dessen Identifizierung

nach Möglichkeit noch andere analytische Verfahren herangezogen werden (UV- und IR-Spektroskopie, Papierchromatographie, Gaschromatographie). Häufig läßt sich durch Vergleich mit dem Untersuchungsergebnis einer Harnprobe der Arzneistoff auf Grund der zusätzlich gefundenen Abbauprodukte identifizieren. Bei Leichensachen kann natürlich das Ergebnis von Analysen des Mageninhaltes und der Organe mit zur Beurteilung herangezogen werden.

4. Die Blutprobe ist alt und weitgehend zersetzt. Das Verfahren ist so gestaltet worden, daß es auch bei Untersuchung alter und fauliger Blutproben gute Ergebnisse liefert. Es empfiehlt sich aber, bei zersetzten Blutproben den Zusatz der Ammonmolybdatlösung um 5 Tropfen zu vergrößern.

C. SCHLÜSSE UND FOLGERUNGEN, DIE SICH AUS DEM ERGEBNIS DER CHEMISCHEN ANALYSE ERGEBEN

Das Ergebnis der chemischen Untersuchung des Blutes auf Arzneistoffe bildet meist neben dem Befund der Harnanalyse die Grundlage für die Erstellung von toxikologischen Gutachten. Bei Strafsachen, insbesondere bei Verkehrsstrafsachen, muß die Frage geklärt werden, ob der Beschuldigte zum Zeitpunkt der Tat unter der Einwirkung von Arzneimitteln (natürlich auch von Alkohol) gestanden hat. Dabei ist es zunächst wichtig, zu klären, ob überhaupt eine behauptete Einnahme von bestimmten Medikamenten stattgefunden hat, und ob eventuell noch andere Medikamente eingenommen worden sind. Als wichtigster Punkt ist außerdem abzuschätzen, wie groß die Arzneimittelkonzentration im Zeitpunkt der Tat gewesen sein kann und ob sie mit der behaupteten Menge der Arzneimittelzufuhr annähernd übereinstimmt.

Bei Leichensachen kann im Verein mit den Analysenergebnissen der anderen Leichenteile geprüft werden, ob die Arzneimittelvergiftung allein oder als wesentlich mitwirkende Ursache zum Tode geführt hat.

Bei der Beurteilung des Analysenergebnisses wird davon ausgegangen, daß die Konzentration des unveränderten Arzneimittels im Blut in unmittelbarer Beziehung zum pharmakologischen Wirkbild steht. Für die meisten Arzneistoffe kann man annehmen, daß der freien unveränderten Form des Arzneimittels die Hauptwirkung des Medikaments zukommt. Abbauprodukte und gekoppelte Produkte finden sich im Blut nur in geringen Mengen. Deshalb ist bei der Entwicklung des Analysenverfahrens auf den Nachweis dieser Produkte kein Wert gelegt worden.

Nach neueren Erkenntnissen ist es nicht ohne weiteres möglich - wie es von juristischer Seite zur Objektivierung des Tatbestandes wünschenswert erscheinen mag (SCHNEIDER (103)) - (etwa wie bei der Beurteilung des Blutalkoholgehaltes) vom Arzneistoffspiegel des Blutes direkt auf die

Wirkung zu schließen. Genauere Rückschlüsse sind nur dann möglich, wenn das Verhalten des Beschuldigten im Zeitpunkt der Tat Hinweise für den Grad der Medikamentenbeeinflussung erkennen läßt und das Ergebnis der Blutanalyse bestätigt.

Aus dem Schrifttum geht hervor, daß aus der festgestellten Arzneistoffkonzentration im Blut eine genaue Aussage über die Dosis des eingenommenen Arzneistoffs nicht möglich ist. Man kann zur Zeit nur folgende Aussagen machen:

1. Bei negativem Untersuchungsbefund können noch Arzneistoffkonzentrationen vorliegen, die unter der Nachweisgrenze liegen.
2. Die Arzneistoffkonzentration des Blutes liegt im Bereich der therapeutischen Dosierung. Die therapeutische Dosis erzeugt nach oraler Einnahme oder nach parenteraler Zufuhr des Arzneimittels in den Körper einen bestimmten Wert der Blutkonzentration, der von bestimmten individuellen Faktoren abhängig ist und der den Angaben der Literatur zu entnehmen ist. Man kann davon ausgehen, daß in vielen Fällen auch noch eine mehrfach höhere Konzentration als therapeutisch anzusehen ist. Eine Beurteilung dieses Sachverhaltes kann nur von medizinischer Seite vorgenommen werden.

Eine Angabe als therapeutische Dosis ist daher unter den geschilderten Vorbehalten zu verstehen.

3. Die Arzneistoffkonzentration ist deutlich höher als es der therapeutischen Dosis entspricht.
Bei Fällen von Arzneimittelabusus können die Blutkonzentrationen bis zehnmals so hoch wie normal liegen. Eine Zuordnung der eingenommenen Dosis ist nur ungefähr möglich.

Neben dem Ergebnis der Blutanalyse sollte besonders bei der Beurteilung von Straftaten unbedingt das Ergebnis der Harnanalyse mit herangezogen werden. Wichtige Schlüsse auf die Einnahmezeit sind hierdurch möglich.

D. ZUSAMMENFASSUNG:

Von den bisher in der Literatur beschriebenen Nachweis- und Bestimmungsverfahren für Arzneimittel in Blutproben sind nur wenige für Mikrobestimmungen geeignet. In Hinblick auf verkehrsmedizinische Fragestellungen ist eine Lösung dieses Problems von größter Wichtigkeit. Wegen der großen Zahl der Arzneistoffe werden in der vorliegenden Arbeit nur die Gruppen der im sauren und neutralen Milieu durch organische Lösungsmittel extrahierbaren Arzneistoffe untersucht.

Für den Nachweis bietet sich wegen der gewöhnlich sehr geringen Restblutmenge (2 - 4 ml) nach der Blutalkoholbestimmung die Dünnschichtchromatographie als empfindliches und relativ einfaches Verfahren an.

Eine sichere Auftrennung und Identifizierung aller in Frage kommenden sauren Arzneistoffe durch ein oder mehrere Dünnschicht - Systeme ist nach den bisher vorliegenden Arbeiten und nach eigenen Erfahrungen nicht durchführbar. Bei einer Hitzebehandlung mit Schwefelsäure kann man eine Unterscheidung von bisher nicht auftrennbaren Barbituraten treffen. Die Kombination des neu entwickelten Dünnschicht - Systems Kieselgel - Chloroform - Isopropanol - Azeton - NH_3 (25%ig) 75 : 25 : 5 : 10 mit und ohne Schwefelsäurebehandlung mit der Dünnschichtchromatographie in dem System Kieselgel - Chloroform - Azeton 9 : 1 ermöglicht eine Identifizierung der meisten toxikologisch wichtigen sauren Arzneistoffe.

Für die Auftrennung der Neutralstoffe mittels der Dünnschichtchromatographie wurden zwei neue Systeme entwickelt: Kieselgel - Chloroform - Azeton - NH_3 (25%ig) 100 : 5 : 10 und Kieselgel - Dichlormethan - Tetrachlormethan - Azeton - Ameisensäure 60 : 40 : 10 : 4. Diese zeichnen sich durch ihre gegensätzlichen Eigenschaften aus und ermöglichen in Verbindung mit dem dritten System die Identifizierung der meisten Neutralstoffe.

Die Extraktion der sauren und neutralen Arzneistoffe wird nach einem weitgehend veränderten Verfahren von SUNSHINE und GERBER vorgenommen, das für die spektrophotometrische Bestimmung der Arzneistoffe angegeben wurde.

Die schwerwiegenden Nachteile des ursprünglichen Verfahrens:

1. die unbefriedigende Reindarstellung der neutralen Arzneistoffe bei der Isolierung aus Blutproben,
2. die mangelhaften Ausbeuten der Neutralstoffe bei der Ausschüttelung aus stark alkalischen Lösungen,
3. die ungenügende Berücksichtigung der Empfindlichkeit der Neutralstoffe gegenüber alkalischen Lösungen und die unzureichenden Maßnahmen zur Vermeidung von Verdampfungsverlusten der leicht flüchtigen Neutralstoffe

gaben Anlaß, nach Verbesserungen des ursprünglichen Analysenverfahrens zu suchen, die schließlich zu einer fast vollständigen Behebung der festgestellten Störungen geführt haben.

Da sich gezeigt hat, daß aus dem Blut mitextrahierte Begleitstoffe (hauptsächlich Phospholipide) die Anwesenheit von Arzneistoffen vortäuschen können, wurde ganz besondere Sorgfalt der Entfernung aller den Nachweis auf der Dünnschicht störenden Begleitstoffe gewidmet. Dieses Problem hatte bei den bisher bekannt gewordenen Untersuchungen eine viel zu geringe Beachtung gefunden.

Die Überprüfung der verschiedenen in der Literatur genannten Extraktions- und Reinigungsverfahren sowie der dabei verwendeten Lösungsmittel hat gezeigt, daß die beste Reinigung zunächst durch eine Azetonextraktion der mit Kieselgur verriebenen, angesäuerten Blutprobe erzielt wird.

Große Schwierigkeiten bereitete nunmehr die weitere Reinigung dieses Azetonauszuges. Zur Entfernung der Störsubstanzen wurden eingehende Untersuchungen durch Anwendung von Adsorptions- und Verteilungsverfahren auf Säu-

len sowie auf Dünnschichten mit Imprägnierung und mit umgekehrten Phasen vorgenommen. Alle diese Verfahren mußten jedoch wegen der irreversiblen Adsorption der Arzneistoffe und der damit verbundenen Ausbeuteverluste aufgegeben werden.

Nachdem durch Untersuchungen der störenden Begleitstoffe festgestellt worden war, daß diese zum größten Teil aus Phospholipiden bestehen, konnten geeignete Maßnahmen zu ihrer Beseitigung aus den Extrakten ergriffen werden. Durch Fällung der wässrigen Extraktlösung mit Molybdänsäure (Ammoniummolybdat in salpetersaurer Lösung) und durch anschließende saure Hydrolyse konnte schließlich die Hauptmenge der Verunreinigungen entfernt werden.

Die Entfernung restlicher Verunreinigungen erfolgte danach mit Hilfe eines in einer gepufferten alkalischen Lösung (pH 10,7) erzeugten Niederschlages von Bleihydroxid. Aus dieser Lösung können die Neutralstoffe mit guten Ausbeuten mit Chloroform ausgeschüttelt werden, ohne daß sie hierbei Veränderungen durch Zersetzung erleiden.

Die Chloroformphase wird weiter durch Ausschütteln mit 10%iger Phosphorsäure gereinigt. Bei der Gewinnung der Neutralstoffe durch Abdampfen des Chloroforms können infolge der sehr geringen Menge der von Begleitstoffen weitgehend befreiten Substanz Verluste durch Verdampfung entstehen. Diese können durch Verdunsten der Lösungsmittel bei Zimmertemperatur im mäßigen Luftstrom unter Hinzufügung einer geringen Wassermenge weitgehend vermieden werden.

Die sauren Arzneistoffe bleiben in der schwach alkalischen Lösung und werden dadurch von den Neutralstoffen getrennt. Sie werden aus der angesäuerten wässrigen Phase durch Extraktion mit Chloroform gewonnen.

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen der bei Modellversuchen aus Blutproben isolierten Arzneistoffe haben ergeben, daß je nach der Natur der Stoffe 60 - 90 %

der den Blutproben zugesetzten Arzneimittel wiedergewonnen und identifiziert werden können.

Die Auswertung der Ergebnisse des neuen Analysenverfahrens ermöglicht es, bei Verkehrs- oder anderen Strafsachen sowie bei toxikologischen Untersuchungen, außer der Identifizierung der im Blut enthaltenen Arzneistoffe, folgende Aussagen zu machen:

1. Die Blutprobe enthält keine oder unter der Nachweisgrenze von 10 µg liegende Mengen von Arzneistoffen.
2. Im Blut befinden sich Arzneistoffkonzentrationen, die auf die Einnahme einer therapeutischen Dosis schließen lassen.
3. Im Blut liegen Arzneistoffgehalte vor, deren Konzentrationen eine vielfache therapeutische Dosis wahrscheinlich machen.

Literaturverzeichnis

- 1 STEWART, C.P. and STOLMAN A.
Toxicology, Mechanisms and Analytical Methods
Academic Press, New York - London,
Volume I, 1960.
- 2 dieselben
Volume II, 1961.
- 3 STOLMAN, A.
Progress in Chemical Toxicology
Academic Press, New York - London,
Volume I, 1963.
- 4 derselbe
Volume II, 1965.
- 5 LEDERER, E. and LEDERER, M.
Chromatography
Elsevier Publishing Comp.
Amsterdam - Houston - London - New York, 1955.
- 6 MERCK, E.
Chromatographie
Darmstadt.
- 7 BAMANN, E. und ULLMANN, E.
Chemische Untersuchungen von Arzneimischen,
Arzneispezialitäten und Giftstoffen.
2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesell-
schaft m.b.H. Stuttgart, 1960.
- 8 STAHL, E.
Dünnschichtchromatographie
Springer Verlag
Berlin - Göttingen - Heidelberg, 1962.

- 9 RANDEKATH, K.
Dünnschichtchromatographie
Verlag Chemie G.m.b.H.
Weinheim/Bergstraße 1962

- 10 HAKS, I.M. und MACEK, K.
Handbuch der Papierchromatographie
I., II., III. Band
VEB Gustav Fischer Verlag,
Jena 1958, 1960, 1963.

- 11 CRAMER, F.
Papierchromatographie
3., ergänzte Auflage
Verlag Chemie G.m.b.H.
Weinheim/Bergstraße 1954.

- 12 RAUEN, H.M.
Biochemisches Taschenbuch
1. und 2. Teil
Springer Verlag
Berlin - Göttingen - Heidelberg 1964.

- 13 LUNDQUIST, F.
Methods of Forensic Science
Volume I
Interscience Publishers
New York - London 1962.

- 14 Arzneibüro der ABDA
Pharmazeutische Stoffliste
Werbe- und Vertriebsgesellschaft Deutscher Apotheker G.m.b.H.
Frankfurt a. Main.

- 15 BAUER, H. und MOLL, H.
Die organische Analyse
Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig
K.G.
Leipzig 1960.

- 16 HOPPE - SEYLER / THIERFELDER
Handbuch der physiologischen und physiologisch-
chemischen Analyse
10. Auflage, 5, Band, S.1-181, 738-885
Springer Verlag
Berlin - Göttingen - Heidelberg 1953.
- 17 WAGNER, H.J.
Arzneim. Forsch. 12, 992 - 995, 1961.
- 18 derselbe
Vortrag auf der 1. Intern. Tagung der Verkehrs-
medizin in Rom am 28. 3. 1963.
- 19 OSTERHAUS, E.
Med. Sachverst. 4, 83, 1964.
- 20 PRIBILLA, O.
Zbl. Verk.-Med. 11, 88 - 100, 1965.
- 21 VIDIC, E.
Mitt. dtsch. Ges. Verkehrsmed. e.V.
8, 51, 1960.
- 22 SCHMIDT, G.
Arzneim. Forsch. 12, 1081 - 1085, 1962.
- 23 SOEHRING, K.
Pharm. Ztg. 106, 637, 1961.
- 24 OSTERHAUS, E.
Arzneim. Forsch. 14, 923 - 929, 1964.
- 25 KREUSCHER, H. und FREY, R.
Arzneim. Forsch. 12, 1056 - 1059, 1962.
- 26 SCHMIDT, G.
Bayr. Ärztebl. Hft. 7, 485 - 489, 1963.
- 27 STAS, J.
Bull. acad. royale m^{éd}. Belgique, Brussel.
- 28 OTTO, F.
J. Ann. 100, 39, 1856.

- 29 FREIMUTH, H.C.
in (1), S. 293.
- 30 GOULD, T.C. und HINE, C.H.
J. Lab. Clinic. Med. 34, 1462, 1949.
- 31 BÄUMLER, J. und RIPPSTEIN, S.
Pharm. Act. Helv. 36, 382, 1961.
- 32 BONNICHSEN, R., MAEHLY, A.C. und FRANK, A.J.
J. Forensic. Sci. 6, 411, 1961.
- 33 GOLDBAUM, L.R.
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 94, 68, 1948.
- 34 CURRY, A.S.
in (2), S. 194 f.
- 35 MacCALLUM, N.E.W.
J. Pharm. et Pharmacol. 6, 733, 1954.
- 36 SUNSHINE, I. and GERBER, S.R.
Spectrophometric analysis of drugs including
atlas of spectra.
Charles C. Thomas publishers, 1963.
Springfield, Illinois, USA.
- 37 SHEPPARD, H., MOWLES, T.F. und PLUMER, A.J.
J. Ann. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 49, 722, 1960.
- 38 ALGERI, E.J. und KATSAS, G.G.
J. Forensic. Sci. 5, 217, 1960.
- 39 ALHA, A.R. und LINDFORS, R.O.
Ann. Med. Exptl. Biol. Fenn. (Helsinki)
37, 149, 1949.
- 40 FELDSTEIN, M. und KLENDSHOJ, N.C.
Analyst, 78, 43, 1953.
- 41 UMBERGER, C.J., STOLMAN, A. und SCHWARZ, H.
Proc. Ann. Acad. Forensic. Sci. 1, 250, 1951.
- 42 CURRY, A.S. und PHANG, S.E.
J. Pharm. and Pharmacol. 12, 437, 1960.

- 43 KOPPANYI, T., DILLE, J.M., MURPHY, W.S.
und KROPS, S.J.
J. Ann. Pharm. Assoc. 23, 1074, 1934.
- 44 RAVENTOS, J.
Brit. J. Pharmacol. 1, 210, 1946.
- 45 LEVY, G.A.
Biochem. J. 34, 73, 1940.
- 46 VIDIC, E.
unveröff. Mitt.: Die quantitative Bestimmung von
Doriden (Glutethimid) in Blut und Geweben.
- 47 STREET, H.V.
J. Forensic. Sci. 7, 222, 1962.
- 48 FOLIN, C. und WU, H.
J. biol. Chem. 38, 81, 1919.
- 49 FELDSTEIN, M.
in (1), S.491.
- 50 CURRY, A.S.
in (1), S. 509 f.
- 51 derselbe
in (2), S.202
- 52 VIDIC, E.
Arch. f. Toxikol. 21, 43 - 66, 1965.
- 53 KELEMEN, J. und PATAKI, G.
Z. f. analyt. Chem. 195, 81, 1963.
- 54 PAULUS, W.
Arch. f. Toxikol. 20, 191 - 193, 1963.
- 55 MACHATA, G.
Microchim. act. 1/1960, 79.
- 56 BÄUMLER, J. und RIPPSTEIN, S.
Pharm. Act. Helvet. 38, 785, 1963.
- 57 UHLMANN, H.J.
Pharm. Ztg. 52, 1998, 1964.

- 58 EBERHARDT, H., FREUNDT, K.J. und LANGBEIN, J.W.
Arzneim. Forsch. 11, 1087, 1962.
- 59 WALDI, D.
in (8), S.328.
- 60 FRAHM, M., GOTTERSLEBEN, A. und SOEHRING, K.
Pharm. Act. Helvet. 38, 785, 1963.
- 61 MAYNERT, E.W. und DAWSON, J.M.
J. biol. chem. 195, 389, 1953.
- 62 STREET, H.V. und MacMARTIN, C.
Clin. Chim. Act. 9, 301, 1964.
- 63 PETZOLD, J.A., CAMP, W.J.R. und KIRCH, E.R.
J. Pharm. Sci. Vol. 52, 11, 1106, 1963.
- 64 LINDFORS, R. und RUOHONEN, A.
Arch. f. Toxikol. 19, 402 - 407, 1962.
- 65 PARRI, W.
Boll. chim. farm. 63, 4011, 1924.
- 66 ZWIKKER, J.J.L.
Pharm. Weekblad, 68, 975, 1931 und
Pharm. Weekblad, 69, 1178, 1932.
- 67 KOPPANYI, Th.
J. Forensic. Med. 4, 65, 1957.
- 68 SUNSHINE, I., ROSE, E. und LeBEAU, J.
Clin. Chem. 9, 312, 1963.
- 69 CURRY, A.S.
in (2), S.167, Tab. III.
- 70 WEICHSEL, H.
Microchim. Act. 2/1965, 325.
- 71 RYDON, H.N. und SMITH, P.W.G.
Nature, 169, 922, 1952.
- 72 VIDIC, E.
Arch. Toxikol. 17, 373 - 386, 1959.

- 73 GILCREAS, F.W. und HALLINAN, F.J.
Ann. Chem. Abstr. 34, 1108, 1940.
- 74 SCHMIDT, H.
Zschr. anal. Chem. 126, 355, 1935.
- 75 BÄUMLER, J. und RIPPSTEIN, S.
Arch. d. Pharm. 296, 301 - 306, 1963.
- 76 DRESSLER, H.
Arch. f. Toxikol. 17, 293 - 294, 1959.
- 77 JATZKEWITZ, H.
Z. physiol. Chem. 292, 94, 1953.
- 78 STRAIN, H.H.
Chromatographic Adsorption Analysis,
Interscience Publ., Inc., New York, 1942.
- 79 BROCKMANN, H. und SCHODDER, H.
Ber. dtsh. chem. Ges. 74, 73, 1941.
- 80 HAGEDORN, H.C. und JENSEN, B.N.
Biochem. Zschr. 135, 46, 1923.
- 81 FUJITA, A. und IWATAKE, D.
Biochem. Zschr. 242, 43, 1931.
- 82 PAULUS, W. und MALLACH, H.J.
Arzneim. Forsch. 4, 391, 1954.
- 83 deTIEGE-ROBINET, S. und LAPIERE, Ch.
J. Pharm. Belg. 13, 437, 1958.
- 84 FISCHER, R. und IWANOFF, W.
Arch. Pharm. 281, 361, 1943.
- 85 MacCALLUM, N.E.W.
J. Pharm. and Pharmacol. 7, 276, 1955.
- 86 YOSHIMURA, H. und TOKI, S.
Pharm. Bull. Tokyo 6, 15, 1958.
- 87 DEININGER, R.
Arzneim. Forschung 5, 472, 1955.

- 88 BRUNDAGE, J.T. und GRUBER, C.M.
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 59, 379, 1937.
- 89 VIDIC, E.
Beitrag im Lehrbuch der gerichtlichen Medizin
von PONSOLD, erscheint demnächst.
- 90 STOLMAN, A. und STEWARD, C.P.
Analyst 74, 543, 1949.
- 91 STOKES, D.M., CAMP, W.J.R. und KIRCH, E.R.
J. Pharm. Sci. 52, 1106, 1963.
- 92 PETZOLD, J.A., CAMP, W.J.R. und KIRCH, E.R.
J. Pharm. Sci. 52, 1106, 1963.
- 93 HEUERMAN, R.F. und LEVINE, J.
J. Am. Pharm. Assoc. 47, 276, 1958.
- 94 VINCENT, M.C. und BLAKE, M.J.
J. Am. Pharm. Assoc. 48, 359, 1959.
- 95 JINDRA, A. und BALAK, F.
Geskoslot. farm. 6, 148, 1957.
- 96 KAWAHARA, T.
Japan. J. Leg. Med. 9, 116, 1955.
- 97 WEIDMANN, H.
Inaug.-Diss. Freie Universität Berlin, 1961.
- 98 PAULUS, W.
Arch. f. Toxikol. 20, 194 - 196, 1963.
- 99 MACHATA, G.
Wien. klin. Wschr. 71, 301, 1959.
- 100 REMMER, H.
Naunym-Schmiedeberg's Arch. exp.
Path. Pharmac., 243, 479, 1962.

- 101 GOLDBAUM, L.R. und WILLIAMS, M.A.
Anal. Chem. 32, 81 - 84, 1960.
- 102 WAGNER, H., HÖRHAMMER, L. und WOLFF, P.
Biochem. Z. 334, 175, 1961.
- 103 SCHNEIDER, A.
Vortrag auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verkehrsmedizin e.V., Sektion Arzneimittel und Verkehr, März 1966 in Bad Oeynhausen.

Lebenslauf

Am 11. August 1936 wurde ich, Manfred Posch, als Sohn des Hochfrequenzingenieurs Herbert Posch und seiner Ehefrau Erna geb. Thieme in Berlin geboren.

Seit Ende 1942 besuchte ich die Volksschule in Krakau (Polen) und seit Herbst 1946 die Freiherr-vom-Stein-Schule, 1. OWZ, in Berlin-Spandau. Dort bestand ich am 3. 3. 1956 die Reifeprüfung.

Vom 1. 3. 1956 bis 31. 3. 1958 war ich Praktikant in der Schwarzen Adler Apotheke in Berlin-Lichtenrade.

Nach Bestehen der pharmazeutischen Vorprüfung im März 1958 studierte ich ab Sommersemester 1958 Pharmazie an der Freien Universität in Berlin. Gleichzeitig war ich ab Wintersemester 1958/59 für Medizin inscribiert.

Im April 1961 legte ich die Pharmazeutische Prüfung ab und war danach bis August 1962 als Kandidat in der Schlüter - Apotheke in Berlin - Charlottenburg tätig. Ich erhielt im August 1962 die Bestallung als Apotheker und arbeitete bis April 1963 in der Gervinus - Apotheke in Berlin - Charlottenburg.

Danach begann ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Vidic im Institut für gerichtliche und soziale Medizin mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit und studierte gleichzeitig vom Sommersemester 1964 bis zum Wintersemester 1965/66 Medizin.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren Drawert, Eckhardt, Hänsel, Jahr, Krauland, Lassen, Lautsch, Rommney, Schenck, Schmidt, Schütte, Vidic und Wojahn, die Herren Dozenten Clemens, Frömming, Koransky und Loth sowie die Herren Dr. Langen und Dr. Seelert.

